

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

LE RÔLE DES PROTÉINES ANTI-APOPTOTIQUES DE LA FAMILLE BCL-2  
ET DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION ANTI-OXYDANT NRF2 DANS  
L'EFFET PROTECTEUR DE LA THERMOTOLÉRANCE (40°C).

THÈSE

PRÉSENTÉE

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DU DOCTORAT EN BIOCHIMIE

PAR

AUDREY GLORY

AOÛT 2016

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.07-2011). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## DÉDICACE

*À mes parents et mes sœurs*

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier la Dre. Diana Averill-Bates de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir fait confiance pour effectuer ma thèse sous sa direction. Merci pour ces bons moments passés en congrès à élargir mes horizons scientifiques. Et un merci tout particulier pour ces derniers mois où votre soutien, dans le moment quand même difficile qu'est la fin d'un doctorat, m'a été précieux.

Je voudrais remercier mes évaluateurs, Dr. Volker Blank, Dr. Michael Greenwood et Dre. Joanne Paquin, d'avoir accepté de mettre leur savoir et leur expertise à ma disposition pour corriger cette thèse.

Je souhaite tout particulièrement remercier mes collègues: Marceline Tchouagué, pour ses histoires divertissantes sur le Cameroun, son franc parler et Beyoncé; Mélanie Chow-shi-yée, pour sa gentillesse, sa bonne humeur communicative et sa sensibilité exacerbée envers tout ce qui est "trooop mignooooon"; Sarah Kassis, pour sa gentillesse mêlée de fourberie (je vois clair dans ton jeu maintenant!) et sa générosité, et Bélinda Crobeddu, pour sa joie de vivre et son côté maniaque. Un merci spécial à Maureen Redza pour son animation musicale et ses blagues sur les ciseaux et à ma collègue d'adoption Clara Lafortune et ses talents informatiques; merci pour votre présence et votre soutien dans les moments les plus durs de cette thèse, vous avez supporté mes errances avec tant de patience (DODREY!!!). Merci à toutes pour votre bonne humeur, votre soutien, votre aide et ces montagnes de chocolat qui m'ont permis de traverser ces années de hauts et de bas avec (presque) toujours le sourire...



Un grand merci à Denis Flipo pour son expertise (Live long and prosper!), à Luc Dubé, Jaime Sanchez-Dardon et André Gervais pour leur bonne humeur et leur aide notamment pendant les démos et à Dre. Francine Mayer pour m'avoir fait confiance et m'avoir soutenue, merci d'être devenue ma maman québécoise...

Sur une note plus personnelle, je tiens à remercier mes amis: Mimi, Louise, Dahmane, Wafa, Chirine, Élodie, Loïck, Julie-Éléonore, les jeunes (Florian, Caro, Sam, Nelly, Arnaud et Jo), les grues (Fanny, David, Bruno et Pablo), Gaëlle, Nico, Marion, David, Aurore, Ségolène, Katja, Sido et Vivi. Pour finir, je voudrais remercier Baptiste Coutaud pour ses cookies, son jus d'orange pressé et toutes les autres petites attentions auxquelles j'ai eu droit pour me soutenir et me permettre de traverser cette période stressante.

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES .....	vii
LISTE DES SCHÉMAS .....	ix
LISTE D'ABBRÉVIATION .....	x
RÉSUMÉ.....	xv
CHAPITRE I	
INTRODUCTION .....	1
1.1 Cancer.....	1
1.2 Stress oxydatif.....	5
1.2.1 Espèces réactives de l'oxygène et de l'azote .....	5
1.2.2 Les systèmes antioxydants.....	10
1.3 La voie de signalisation de Nrf2.....	13
1.3.1 Activation et mode d'action .....	13
1.3.2 Modulateurs .....	16
1.3.3 Nrf2 et cancer.....	19
1.4 Mort cellulaire .....	20
1.4.1 Nécrose .....	22
1.4.2 Apoptose .....	22
1.4.3 Autres voies de mort cellulaire .....	36
1.5 Traitements du cancer .....	38
1.5.1 Traitements classiques .....	38
1.5.2 Autres traitements .....	41
1.5.3 Hyperthermie .....	43
1.6 Thermotolérance.....	51
1.6.1 Introduction.....	51
1.6.2 Modes d'action .....	52

1.6.3 Conclusion .....	57
1.7 Présentation du projet.....	58
1.7.1 Introduction.....	58
1.7.2 Hypothèse .....	59
1.7.3 Objectifs du projet.....	59
CHAPITRE II	
ARTICLE I .....	61
2.1 Préface .....	61
2.2 Article I.....	62
2.2.1 Résumé.....	63
2.2.2 Introduction.....	66
2.2.3 Materials and Methods.....	69
2.2.4 Results.....	73
2.2.5 Discussion.....	77
2.2.6 Figures.....	86
CHAPITRE III	
ARTICLE II .....	92
3.1 Préface .....	92
3.2 Article II .....	93
3.2.1 Résumé.....	95
3.2.2 Introduction.....	98
3.2.3 Materials and methods .....	102
3.2.4 Results.....	108
3.2.5 Discussion.....	113
3.2.6 Figures.....	122
CHAPITRE IV	
DISCUSSION.....	131
RÉFÉRENCES .....	143

## LISTE DES FIGURES

Figure	Page
Figure 1.1 Les caractéristiques nécessaires au développement d'une tumeur selon Hanahan et Weinberg.....	3
Figure 1.2 Les différentes voies de formation des ERO .....	6
Figure 1.3 Les différents rôles des ERO en fonction de leur concentration .....	9
Figure 1.4 Le système de régulation de Nrf2/Keap1 en conditions normales et en conditions de stress .....	15
Figure 1.5 Co-régulation positive et négative entre Nrf2 et p53.....	18
Figure 1.6 Voies de mort cellulaire.....	21
Figure 1.7 Voie extrinsèque de l'apoptose .....	27
Figure 1.8 La classification des protéines de la famille Bcl-2 selon leurs domaines BH.....	29
Figure 1.9 Voie de la mitochondrie (intrinsèque) .....	30
Figure 1.10 Voie du réticulum endoplasmique .....	32
Figure 1.11 Régulation de p53 en réponse au stress .....	34
Figure 1.12 Les modifications produites au niveau cellulaire par l'hyperthermie .....	45
Figure 1.13 Représentation schématique d'un traitement par HIFU .....	50
Figure 1.14 La voie de survie du stress ru RE ou réponse UPR .....	56
Figure 1.15 Mécanismes de défenses induits par la thermotolérance (40°C, 3 h). ....	57
Figure 2.1 Heat shock (42-43°C) alters the cellular balance between pro-apoptosis and anti-apoptosis Bcl-2 family proteins: protective role of thermotolerance (40°C).....	86
Figure 2.2 Heat shock (42-43°C) causes relocalization of Bax, Bak, Bim, Puma and Noxa to mitochondria while expression of Bcl-2 and Bcl-xL decreases: reversal by thermotolerance (40°C). ....	87

Figure 2.3 Decreased expression of Bcl-2 family proteins in cytosolic fractions during heat shock (42-43°C): reversal by 40°C thermotolerance.....	88
Figure 2.4 Hyperthermia-induced down-regulation of Bcl-2 involves ROS, and up-regulation of Puma and Noxa involves p53 and ROS. ....	89
Figure 2.5 Bcl-2 inhibitor ATB-737 enhances hyperthermia-induced apoptosis: protective role of mild thermotolerance (40°C).....	90
Figure 3.1 Mild thermotolerance (40°C) protects cells against heat shock (42°C)-induced apoptosis.....	122
Figure 3.2 Preconditioning of cells at 40°C increases expression of Nrf2. ....	124
Figure 3.3 Activity of Nrf2 target catalase increases during preconditioning of cells at 40°C.....	126
Figure 3.4 Mild heat stress (40°C) increases ROS levels in HeLa cells: modulation by altered expression of Nrf2. ....	127
Figure 3.5 Induction of Nrf2 expression after 1 h at 40°C is dependent on ROS and p53.....	128
Figure 3.6 Nrf2 is partially responsible for the protective effect of mild thermotolerance (40°C).....	129

## LISTE DES SCHÉMAS

Schéma	Page
Scheme 2.1 Heat shock (42-43°C) alters the pro-apoptosis/anti-apoptosis balance in Bcl-2 family proteins during apoptosis in HeLa cells. ....	91
Scheme 3.1 The role of ROS and Nrf2 in the onset of mild thermotolerance at 40°C. ....	130

## LISTE D'ABBRÉVIATION

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AFC</b>	Amino trifluorocoumarin
<b>AIF</b>	Facteur d'induction de l'apoptose ( <i>«Apoptosis inducing factor»</i> )
<b>Apaf1</b>	Facteur-1 d'activation des protéases apoptotiques ( <i>«Apoptotic protease activating factor 1»</i> )
<b>ARE</b>	Élément de réponse aux antioxydants ( <i>«Antioxidant response element»</i> )
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ASK-1</b>	Kinase régulant les signaux apoptotiques-1 ( <i>«Apoptosis signal-regulating kinase 1»</i> )
<b>ATF</b>	Facteur de transcription activateur ( <i>«Activating transcription factor»</i> )
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>Bad</b>	Promoteur de mort associé à Bcl-2 ( <i>«Bcl-2-associated death promoter»</i> )
<b>Bak</b>	Tueur antagoniste homologue de Bcl-2 ( <i>«Bcl-2 homologous antagonist killer»</i> )
<b>Bax</b>	Protéine X associée à Bcl-2 ( <i>«Bcl-2-associated X protein»</i> )
<b>Bcl-2</b>	Protéine de lymphome de cellules B 2 ( <i>«B-cell lymphoma protein 2»</i> )
<b>Bcl-w</b>	Protéine ressemblant à Bcl-2 2 ( <i>«Bcl-2-like 2»</i> )
<b>Bcl-xL</b>	Protéine ressemblant à Bcl-2 1 ( <i>«Bcl-2-like 1»</i> )
<b>BH</b>	Domaines d'homologie à Bcl-2 ( <i>«Bcl-2 homology domain»</i> )
<b>Bid</b>	Agoniste des domaines de mort interagissant avec BH3 ( <i>«BH3-interacting-domain death agonist»</i> )
<b>BSA</b>	Albumine de sérum bovin
<b>CAD</b>	DNase activée par les caspases ( <i>«Caspase-activated DNase»</i> )
<b>CARD</b>	Domaine de recrutement et d'activation des caspases ( <i>«Caspase recruitment domain»</i> )
<b>CDK</b>	Kinases cycline-dépendantes
<b>CHOP</b>	Protéine homologue de C-EBP ( <i>«C-EBP homologous protein»</i> )
<b>CNC</b>	«Cap'n'collar»
<b>CO</b>	Monoxyde de carbone
<b>CUL3</b>	Culline-3



<b>Cyt c</b>	Cytochrome c
<b>DAF</b>	Diaminofluoresceine
<b>DD</b>	Domaine de mort (« <i>Death domain</i> »)
<b>DED</b>	Domaine effecteur de mort (« <i>Death effector domain</i> »)
<b>DHE</b>	Dihydroethidium
<b>DISC</b>	Complexe de signalisation induisant la mort (« <i>Death-inducing signaling complex</i> »)
<b>D-MEM</b>	Milieu de culture Eagle tel que modifié par Dulbecco (« <i>Dulbecco's modification of Eagle's medium</i> »)
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>EDTA</b>	Acide éthylène-diamine-tétraacétique (« <i>Ethylene diamine tetraacetic acid</i> »)
<b>EGTA</b>	Acide éthylène-glycol-tétraacétique (« <i>Ethylene glycol tetraacetic acid</i> »)
<b>eIF2<math>\alpha</math></b>	Facteur eucaryotique d'initiation 2 $\alpha$ (« <i>Eukaryotic initiation factor 2<math>\alpha</math></i> »)
<b>ER</b>	«Endoplasmic reticulum»
<b>ERAD</b>	Dégradation des protéines associées au RE (« <i>Endoplasmic reticulum-associated protein degradation</i> »)
<b>ERK</b>	Kinases régulées par des signaux extracellulaires (« <i>Extracellular signal-regulated kinases</i> »)
<b>ERN</b>	Espèces réactives de l'azote
<b>ERO</b>	Espèces réactives de l'oxygène
<b>FADD</b>	Domaine de mort associé à Fas (« <i>Fas-associated death domain</i> »)
<b>FITC</b>	Fluorescéine isothiocyanate
<b>GCL (<math>\gamma</math>-GCS)</b>	Glutamate-cystéine ligase ( $\gamma$ - glutamylcystéine synthétase)
<b>GFP</b>	Protéine fluorescente verte (« <i>Green fluorescent protein</i> »)
<b>GPx1</b>	Glutathion peroxydase 1
<b>GSH</b>	Glutathion réduit
<b>GSR</b>	Glutathion S-réductase
<b>GSSG</b>	Glutathion oxydé
<b>GST</b>	Glutathion S-transférase
<b>H<sub>2</sub>DCFDA</b>	«2'-7'-dihydrodichloro-fluorescein diacetate»
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peroxyde d'hydrogène
<b>HeLa</b>	Cellules humaines de carcinome du col de l'utérus
<b>HIF</b>	Facteur de transcription induit par hypoxie (« <i>Hypoxia inducible factors</i> »)
<b>HIFU</b>	Ultrasons focalisés de haute intensité (« <i>High-intensity focused ultrasound</i> »)



<b>HO<sup>•</sup></b>	Radical hydroxyle
<b>HO-1</b>	Hème oxygénase-1
<b>HRP</b>	Peroxydase de raifort ( <i>«Horseradish peroxidase»</i> )
<b>Hsf1</b>	Facteur de choc thermique 1 ( <i>«Heat-shock factor 1»</i> )
<b>Hsp</b>	Protéines de choc thermique ( <i>«Heat-shock proteins»</i> )
<b>IAP</b>	Protéines inhibitrices de l'apoptose ( <i>«Inhibitor of apoptosis proteins»</i> )
<b>ICAD</b>	Inhibiteur de CAD
<b>IRE1</b>	Protéine dépendante de l'inositol 1 ( <i>«Inositol-requiring protein 1»</i> )
<b>JNK</b>	Kinases c-Jun N-terminales ( <i>«c-Jun N-terminal kinases»</i> )
<b>Keap1</b>	«Kelch ECH associating protein 1»
<b>MAP kinases</b>	«Mitogen-activated protein kinases»
<b>Mcl-1</b>	«Myeloid cell leukemia-1»
<b>MDM2</b>	«Mouse double minute 2»
<b>MEF</b>	Fibroblaste de souris embryonnaire ( <i>«Mouse embryonic fibroblast»</i> )
<b>MnSOD</b>	Manganèse superoxyde dismutase
<b>MOMP</b>	Perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie ( <i>«Mitochondrial outer membrane permeabilization»</i> )
<b>MOPS</b>	Acide 3-(N-morpholino)-propane sulfonique ( <i>«3-(N-morpholino)-propane sulfonic acid»</i> )
<b>MTP</b>	Perméabilité transitoire de la mitochondrie ( <i>«Mitochondrial permeability transition»</i> )
<b>NADPH</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
<b>NF-κB</b>	Facteur nucléaire-κB ( <i>«Nuclear factor-κB»</i> )
<b>NKT</b>	Cellules T «natural killer»
<b>NO<sup>•</sup></b>	Oxyde nitrique
<b>NOX</b>	NADPH-oxydase
<b>NQO1</b>	NAD(P)H :quinone oxydoréductase 1
<b>NQO2</b>	NRH :quinone oxydoréductase 2
<b>Nrf2</b>	«Nuclear factor erythroid 2-related factor 2»
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	Superoxyde
<b>ONOO<sup>•</sup></b>	Peroxynitrite
<b>PAMP</b>	Motifs moléculaires associées aux pathogènes ( <i>«Pathogen associated molecular patterns»</i> )
<b>PARP</b>	ADN poly(ADP-ribose) polymérase ( <i>«Poly(ADP-ribose) polymerase»</i> )
<b>PBS</b>	«Phosphate-buffered saline»
<b>PC</b>	PEG-catalase

<b>PEG</b>	Polyéthylène glycol
<b>PERK</b>	«Protein kinase RNA (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase»
<b>PI</b>	Iodure de propidium (« <i>Propidium iodide</i> »)
<b>PIDD</b>	Protéine induite par p53 possédant un domaine de mort (« <i>p53-induced protein with a death domain</i> »)
<b>PKB (AKT)</b>	Protéine kinase B
<b>PKC</b>	Protéine kinase C
<b>PMSF</b>	Fluoride phénylméthylsulfonyl
<b>Prx</b>	Peroxyrédoxines
<b>PTP</b>	Protéines tyrosine phosphatases «Permeability transition-pore»
<b>Puma</b>	Modulateur de l'apoptose régulé par p53 (« <i>p53-upregulated modulator of apoptosis</i> »)
<b>P<math>\alpha</math></b>	Pifithrin- $\alpha$
<b>Q</b>	Ubiquinone
<b>Q<math>^{\cdot-}</math></b>	Semiquinone
<b>QH<math>_2</math></b>	Ubiquinol
<b>RE</b>	Réticulum endoplasmique
<b>ROS</b>	«Reactive oxygen species»
<b>SDS-PAGE</b>	«Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis»
<b>SEM</b>	Erreur standard de la moyenne (« <i>Standard error of mean</i> »)
<b>shRNA</b>	«Short hairpin ribonucleic acid»
<b>SOD</b>	Superoxyde dismutase
<b>SP</b>	Sodium pyruvate
<b>tBid</b>	Bid tronqué
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Facteur de croissance transformant- $\beta$ (« <i>Transforming growth factor-<math>\beta</math></i> »)
<b>TM</b>	Domaine transmembranaire
<b>TNF</b>	Facteur de nécrose tumorale (« <i>Tumor necrosis factor</i> »)
<b>TNFR</b>	Récepteur des facteurs de nécrose tumorale (« <i>Tumor necrosis factor receptor</i> »)
<b>TRADD</b>	Domaine de mort associé au récepteur TNF (« <i>TNFR-associated death domain protein</i> »)
<b>TRAF-2</b>	Facteur associé au récepteur TNF 2 (« <i>TNF Receptor-Associated Factor-2</i> »)
<b>Trx</b>	Thiorédoxines
<b>TrxR</b>	Thiorédoxines réductases
<b>UPR</b>	Réponse aux protéines mal repliées (« <i>Unfolded protein response</i> »)
<b>UV</b>	Ultra-violets

<b>VEGF</b>	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (« <i>Vascular endothelial growth factor</i> »)
<b>XPB1</b>	Protéine de liaison à la X-box 1 «X-box binding protein 1»

## RÉSUMÉ

L'hyperthermie (41-45°C), ou thermothérapie, est un traitement contre le cancer utilisé en combinaison avec la radio- et la chimiothérapie. L'hyperthermie crée des réactions de stress dans les cellules cancéreuses qui mènent à leur mort par apoptose. Malgré de nombreux progrès dans son utilisation clinique, les mécanismes impliqués dans la réponse cellulaire à l'hyperthermie ne sont pas encore élucidés. La thermotolérance est une réponse adaptative qui apparaît en réponse à l'hyperthermie. Elle permet l'induction de défenses (protéines de choc thermique, réponse aux protéines mal-repliées (UPR), antioxydants) qui permettront à la cellule de survivre un stress subséquent de choc thermique aigu. La thermotolérance pourrait donc représenter un obstacle aux traitements par hyperthermie, mais son effet est transitoire et n'a donc pas d'impact sur les traitements. La thermotolérance peut être induite suite à une exposition courte (<1 h) à de fortes températures (42-45°C) ou suite à une exposition longue (≥3 h) à des températures modérées (39-40°C). Ce deuxième type de thermotolérance peut être induit lors d'un état fébrile, la fièvre étant un effet secondaire courant de l'hyperthermie. Cette thermotolérance modérée est encore peu étudiée et mal comprise. Les deux objectifs principaux de cette étude sont (1) de mieux comprendre les mécanismes de mort cellulaire induits par hyperthermie (42-43°C), notamment par la voie de l'apoptose mitochondriale et les protéines de la famille Bcl-2, ainsi que l'impact de la thermotolérance (40°C) sur cette voie, et (2) d'étudier l'implication possible du facteur de transcription antioxydant «nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2» (Nrf2) dans l'induction de la thermotolérance.

L'objectif premier est de déterminer la réponse des protéines de la famille Bcl-2 impliquées dans la voie apoptotique mitochondriale lors de chocs thermiques

intenses (42-43°C) ou modérés (40°C). En effet, bien que l'implication des protéines Bcl-2 dans l'induction de l'apoptose soit claire, leur réponse à l'hyperthermie est méconnu. L'expression de diverses protéines pro-apoptotiques (Bax, Bak, Puma et Noxa) et anti-apoptotiques (Bcl-2 et Bcl-xL) de cette famille a donc été étudiée par Western Blot. L'hyperthermie (42-43°C) diminue l'expression totale et mitochondriale de Bcl-2 et Bcl-xL et augmente l'expression mitochondriale de Bax, Bak, Puma et Noxa. Ce déséquilibre par l'hyperthermie de l'équilibre au sein de la famille de protéines Bcl-2 s'effectue donc en faveur de ses membres pro-apoptotiques, menant ensuite à l'augmentation de l'activité des caspases-9 et -3 et à la condensation de la chromatine, marqueur physique de l'entrée en apoptose des cellules. La thermotolérance (40°C) annule ces effets pro-apoptotiques de l'hyperthermie en rétablissant le niveau basal d'expression de ces protéines Bcl-2, et permet donc de diminuer l'activité des caspases-9 et -3 et le taux global d'apoptose chez les cellules exposées à un choc thermique à 42-43°C. L'inhibiteur de Bcl-2 et Bcl-xL, ABT-737, exacerbe les effets de l'hyperthermie, aboutissant donc à un taux d'apoptose plus élevé que sans inhibiteur. Des inhibiteurs des membres anti-apoptotiques de Bcl-2 sont déjà développés en clinique; leur utilisation en combinaison avec l'hyperthermie pourrait donc être envisagée afin d'améliorer l'efficacité de cette dernière. En inhibant les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, l'ABT-737 cause une diminution de l'effet protecteur de la thermotolérance, prouvant ainsi l'implication de ces protéines dans la mise en place de cette réponse adaptative. La thermotolérance protège donc les cellules contre l'apoptose induite par les chocs thermiques en modulant des effecteurs de la voie mitochondriale.

Le deuxième objectif est de déterminer l'implication du facteur de transcription antioxydant Nrf2 dans l'induction de la thermotolérance (40°C). Il a déjà été prouvé que la thermotolérance (40°C, 3 h) induit l'augmentation de la présence d'antioxydants (manganèse superoxyde dismutase (MnSOD), glutamate-cystéine ligase (GCL), glutathion, catalase) dans les cellules (Pallepati et Averill-Bates, 2010).



Nous avons donc voulu évaluer si cette augmentation pouvait être liée à l'activation du facteur de transcription Nrf2, qui a pour cible de nombreux gènes codant pour des antioxydants tels la catalase. L'exposition des cellules à 40°C pendant 30 à 60 min permet l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) tels que superoxyde, peroxydes et nitrique oxyde. Après 1 h à 40°C, on observe un pic d'expression de Nrf2, qui se traduit par l'augmentation de l'activité de la catalase à partir de 1 h. L'induction de la thermotolérance passerait donc par une augmentation précoce des ERO qui déclencherait ensuite la voie antioxydante de Nrf2 afin d'activer la production d'antioxydants. L'inhibition de Nrf2 par l'utilisation d'un shARN est capable de diminuer l'effet protecteur de la thermotolérance (40°C, 3 h) à l'encontre de l'apoptose induite par un choc thermique (42°C, 3 h), alors que l'augmentation de l'expression de Nrf2 par l'oltipraz permet d'augmenter cet effet protecteur. Les ERO et le facteur de transcription Nrf2 sont donc impliqués dans la mise en place des réponses de survie caractéristiques de la thermotolérance à 40°C.

En conclusion, cette étude permet d'ajouter aux connaissances sur les mécanismes apoptotiques induits par l'hyperthermie (42-43°C). Elle permet également de mieux comprendre l'effet protecteur de la thermotolérance, réponse adaptative induite par un stress thermique modéré (40°C). Les éléments précoces d'induction de la thermotolérance ont notamment été élucidés. Ces connaissances pourront permettre d'envisager une utilisation de la thermotolérance afin de traiter des maladies liées aux stress cellulaires.

Mots clefs: hyperthermie, thermotolerance, protéines Bcl-2, Nrf2, espèces réactives de l'oxygène, antioxydant

## CHAPITRE I

### INTRODUCTION

#### 1.1 Cancer

Le corps humain est constitué de milliards de cellules organisées de façon à former des tissus et des organes. Ces cellules contiennent dans leur noyau des brins d'acide désoxyribonucléique (ADN) codant pour leur génome, c'est-à-dire l'ensemble des gènes qui permettent le fonctionnement d'une cellule, de sa division à sa mort. Des changements, appelés mutations, au niveau de la séquence de ces gènes peuvent modifier les protéines pour lesquelles ils codent et mener à un mauvais fonctionnement des cellules, pouvant provoquer diverses maladies, dont le cancer. Ces mutations peuvent être spontanées ou provoquées par des agents mutagènes tels les ultra-violets (UV) ou l'amiante.

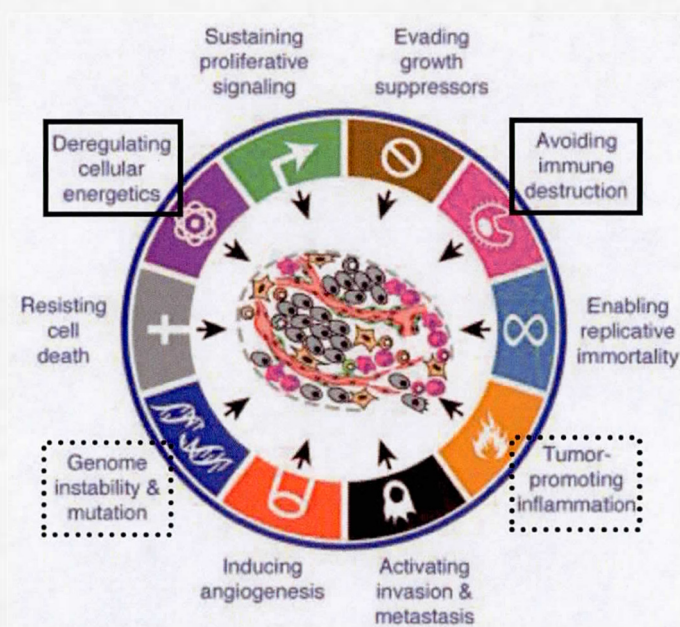
Dans l'article «The hallmarks of cancer» publié en 2000 dans *Cell* (Hanahan et Weinberg, 2000), Hanahan et Weinberg ont décrit les six caractéristiques principales qu'une cellule doit posséder afin de pouvoir se transformer en tumeur (Fig. 1.1). Deux de ces caractéristiques sont le maintien de la prolifération cellulaire et la résistance aux mécanismes de mort, notamment à travers la perturbation du cycle cellulaire. En effet, les cellules cancéreuses présentent souvent des mutations au niveau de gènes codants pour le maintien de l'homéostasie ou pour le fonctionnement du cycle cellulaire (Hanahan et Weinberg, 2000). Une fois ce cycle perturbé, la cellule va entrer en phase de prolifération permanente, évitant ainsi les mécanismes de mort. La cellule doit également être capable de résister aux inhibiteurs de croissance et

d'augmenter la capacité de réplication de son matériel génétique pour pouvoir continuer à proliférer. Ces quatre premières étapes favorisent la multiplication du nombre de cellules cancéreuses pour finalement aboutir à la formation d'une tumeur, celle-ci pouvant contenir plus d'un milliard de cellules. Afin de maintenir une telle masse cellulaire, deux autres caractéristiques sont nécessaires : l'induction de l'angiogenèse pour former des vaisseaux sanguins autour et au sein de la tumeur afin de lui fournir les éléments nécessaires à sa survie, et finalement l'activation des mécanismes d'invasion et de métastase. Les métastases sont des groupes de cellules cancéreuses qui se détachent de la tumeur principale et se déplacent dans le sang ou la lymphe, conduisant à la colonisation d'autres organes (Hanahan et Weinberg, 2000).

En 2011, à la suite d'une décennie de progrès au niveau de notre compréhension du cancer, Hanahan et Weinberg ont ajouté deux autres caractéristiques essentielles ainsi que deux critères facilitant la transformation cellulaire (Fig. 1.1) (Hanahan et Weinberg, 2011). La première de ces caractéristiques essentielles est la dérégulation du métabolisme énergétique de la cellule. Effectivement, les cellules cancéreuses sont connues pour produire la plupart de leur énergie via la glycolyse. Le taux de glycolyse est donc fortement augmenté, au détriment d'autres voies cataboliques telles le cycle de l'acide citrique. Cette situation est bénéfique en cas d'hypoxie, comme dans le centre de la tumeur, car l'obtention d'énergie par la chaîne respiratoire de la mitochondrie n'est alors pas possible. Il est plus difficile de comprendre pourquoi les cellules cancéreuses préfèrent la glycolyse en cas de normoxie; une hypothèse est que les intermédiaires de la glycolyse peuvent être utilisés dans d'autres voies métaboliques, notamment le glucose 6-phosphate qui pourra entrer dans la voie des pentoses phosphates pour synthétiser les acides aminés nécessaires à la formation de l'ADN et dont les cellules ont besoin en grand nombre pour maintenir un taux élevé de réplication de l'ADN (Hanahan et Weinberg, 2011). La deuxième caractéristique essentielle est l'évasion du système immunitaire. En effet, le système immunitaire est capable de reconnaître la tumeur comme étant un



phénomène anormal; il tentera donc de la détruire et il y parvient dans la plupart des cas, grâce aux cellules T  $CD8^+$  cytotoxiques et aux cellules T «natural killer» (NKT). Pour éviter cela, certaines cellules cancéreuses seraient donc capables de sécréter des facteurs immunosuppresseurs tels le facteur de croissance transformant- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Hanahan et Weinberg, 2011).



**Figure 1.1 Les caractéristiques nécessaires au développement d'une tumeur selon Hanahan et Weinberg** (adapté de (Hanahan et Weinberg, 2011)). Les deux caractéristiques encadrées en noir sont les deux nouvelles caractéristiques ajoutées dans l'article de 2011 de Hanahan et Weinberg. Les deux critères facilitant la transformation introduits dans cet article sont encadrés en pointillés. Les six caractéristiques originales de l'article de 2000 ne sont pas encadrées.

Parmi les deux critères facilitant la transformation cellulaire, l'un est également lié au système immunitaire. En effet, de nombreuses études démontrent un effet tumorigénique de l'inflammation, car les cellules immunitaires qui y sont liées

(macrophages, mastocytes, neutrophiles et lymphocytes B et T) sont capables de libérer dans le microenvironnement tumoral un grand nombre de molécules pouvant aider la transformation de la cellule. Ces molécules comprennent des facteurs de croissance, des facteurs de survie, des facteurs pro-angiogéniques et des enzymes capables de modifier la matrice extracellulaire afin de faciliter l'angiogenèse et la métastase (Hanahan et Weinberg, 2011). Ces cellules inflammatoires peuvent également libérer des espèces réactives de l'oxygène (ERO), qui de par leur caractère réactif et mutagène vont contribuer à l'altération du génome des cellules cancéreuses. Cette altération du génome constitue le deuxième critère facilitant la transformation cellulaire. En effet, dans le cas du cancer, les systèmes de réparation de l'ADN sont souvent débordés ou simplement non fonctionnels (Cairns *et al.*, 2011). Les mutations à l'ADN ne pouvant plus être réparées, de nombreux effets délétères apparaissent dans les cellules, menant à une situation où la cellule devrait être éliminée. En plus de la présence de ces mutations, les cellules cancéreuses présentent souvent des déficiences au niveau de mécanismes épigénétiques tels que la méthylation de l'ADN et la modification des histones. Ces phénomènes entraînent une instabilité génomique qui, lorsqu'elle atteint des gènes régissant les caractéristiques susmentionnées, mènera à la transformation de la cellule (Hanahan et Weinberg, 2011).

Les systèmes de réparation de l'ADN étant moins efficaces avec l'âge, le vieillissement est un facteur de risque important. Avec l'augmentation de l'espérance de vie observée ces dernières décennies dans les pays les plus développés, le taux de cancer a lui aussi beaucoup augmenté. Ce vieillissement de la population, associé au nombre croissant de produits déclarés carcinogènes présents dans notre environnement, conduit à un besoin urgent de traitements efficaces contre le cancer, qui figure parmi les principales causes de mortalité au monde. De plus, une augmentation de 70% des nouveaux cas est attendue dans les deux prochaines

décennies (McGuire, 2016 ; Organisation mondiale de la santé, 2015 ; Wong et Deng, 2015).

## 1.2 Stress oxydatif

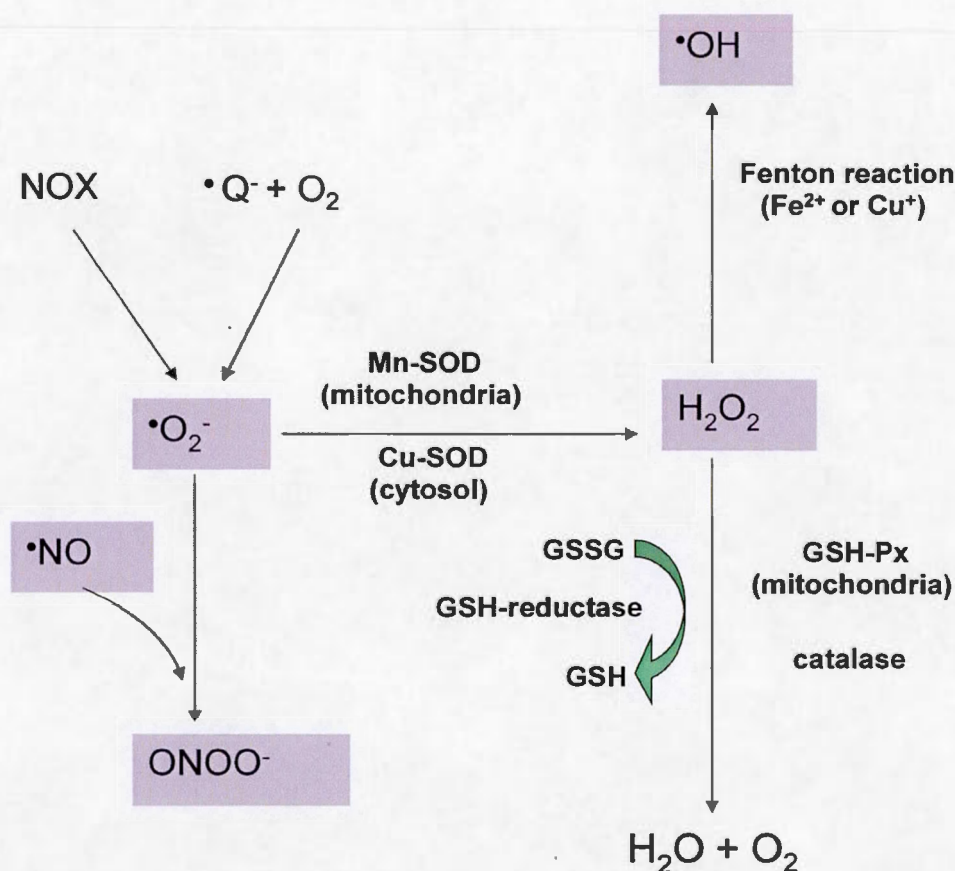
Le stress oxydatif est caractérisé par un déséquilibre entre les antioxydants présents dans la cellule et les espèces réactives, qu'elles soient de l'oxygène (ERO) ou de l'azote (ERN), en faveur de ces dernières (Carmody et Cotter, 2001). Le stress oxydatif peut donc résulter d'un manque d'antioxydants (de par un manque de NADPH,  $H^+$  ou une alimentation pauvre en antioxydants par exemple) ou d'une trop grande production d'espèces réactives due à un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire de la mitochondrie ou encore à la libération de fer par les protéines chélatrices (Pincemail *et al.*, 2002).

### 1.2.1 Espèces réactives de l'oxygène et de l'azote

#### 1.2.1.1 Formation

Les ERO sont principalement formées au niveau de la chaîne respiratoire de la mitochondrie. Au niveau des complexes I et III, l'ubiquinone (Q), qui sert d'intermédiaire pour le passage des électrons peut être partiellement réduite en semiquinone ( $Q^{\bullet}$ ), une espèce radicalaire. En conditions physiologiques, la semiquinone est rapidement complètement réduite en ubiquinol ( $QH_2$ ), mais si la chaîne respiratoire devient saturée en électrons, la semiquinone peut avoir l'occasion de donner son électron à l' $O_2$  pour former l'espèce réactive  $O_2^{\bullet-}$  (anion superoxyde) (Fig. 1.2.). Le superoxyde est une espèce réactive qui peut être transformée en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) spontanément (surtout à pH faible) ou grâce à l'enzyme antioxydante superoxyde dismutase (SOD). Le superoxyde peut également réagir avec l'oxyde nitrique ( $NO^{\bullet}$ ), une ERN, pour former le peroxynitrite ( $ONOO^{\bullet}$ ) (Bedard et Krause, 2007). L' $H_2O_2$  peut être détoxifié par l'enzyme catalase pour former de l'eau et du dioxygène ou par le glutathion (GSH) pour former deux

molécules d'eau. Une troisième possibilité est la dégradation de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  en radical hydroxyle ( $\text{OH}^\bullet$ ) par la réaction de Fenton.



**Figure 1.2 Les différentes voies de formation des ERO** (adapté de (Johansen *et al.*, 2005)). L'ion superoxyde ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) est souvent le premier ERO à être produit, que ce soit par les enzymes NADPH-oxydase (NOX) ou par la réaction d'une semiquinone avec l'oxygène au niveau de la chaîne respiratoire de la mitochondrie. Le superoxyde peut alors réagir avec l'oxyde nitrique ( $\text{NO}^\bullet$ ) pour former le peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ) ou être dismuté en peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), spontanément ou par l'action de superoxyde dismutases (SOD). Le peroxyde d'hydrogène pourra former l'ERO le plus réactif de tous, le radical hydroxyle ( $\text{OH}^\bullet$ ), par la réaction de Fenton. Enfin, l' $\text{H}_2\text{O}_2$  pourra également être réduit en  $\text{H}_2\text{O}$  et en  $\text{O}_2$  par la catalase ou le système du glutathion.



Les ERO peuvent également être produites par les enzymes de la famille NADPH-oxydase (NOX). Ce sont des enzymes transmembranaires qui permettent le transport d'électrons à travers les membranes afin de réduire l'oxygène en superoxyde (Bedard et Krause, 2007). La particularité de ces enzymes est donc qu'elles produisent des ERO, non pas comme produit secondaire mais bien comme produit principal.

D'autres sources d'ERO dans la cellule incluent les xanthines oxydoréductases et les protéines de la famille cytochrome P450, qui jouent un rôle dans le métabolisme des médicaments (Kimura *et al.*, 2005).

#### 1.2.1.2 Effets des ERO

Selon leur concentration dans la cellule, les ERO peuvent avoir des effets positifs (signalisation, défense) ou négatifs (dommages à différentes structures) sur la survie de la cellule. Une concentration en ERO trop faible pourra mener à des problèmes de signalisation tandis qu'une concentration trop forte mènera au stress oxydatif (Fig. 1.3). Le maintien de l'homéostasie est donc primordial.

- Défense de l'organisme :

Les enzymes de la famille NOX ont d'abord été identifiées chez les phagocytes, dans lesquels les ERO qu'elles produisent permettent l'élimination des microorganismes phagocytés. Par exemple, le peroxyde d'hydrogène est capable d'inactiver des facteurs de virulence bactériens. Les ERO jouent donc un rôle dans la défense de l'hôte contre les pathogènes (Bedard et Krause, 2007 ; Di Meo *et al.*, 2016).

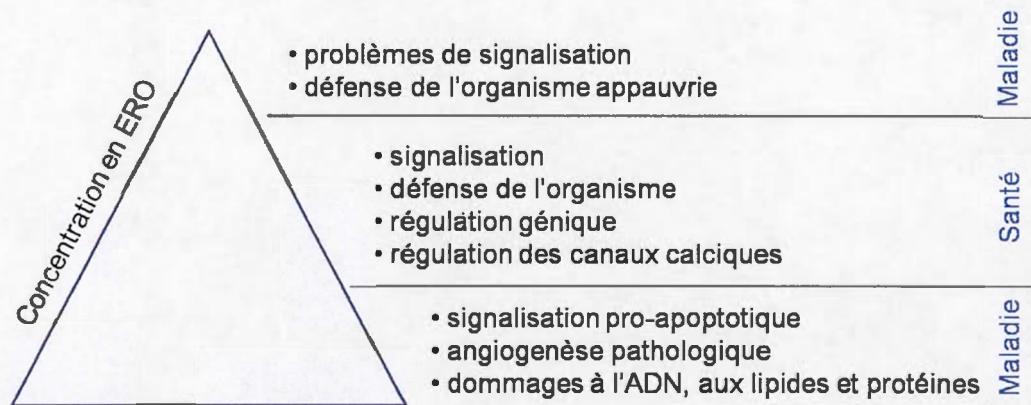
- Signalisation :

De par leur effet sur les résidus cystéines sensibles à l'oxydation, les ERO sont capables de réguler certaines fonctions cellulaires. L'exemple le plus probant est sans doute celui des protéines tyrosine phosphatases (PTP), qui possèdent au niveau de

leur site actif des cystéines pouvant être inactivées par oxydation. Les PTP contrôlent l'état de phosphorylation de nombreuses protéines impliquées dans la régulation de voies de signalisations liées à la prolifération cellulaire, à la différenciation, à la survie, au métabolisme et à la motilité. En oxydant ces résidus cystéines, les ERO peuvent diminuer l'activité des PTP et donc influencer ces nombreuses voies, dont celle des «mitogen-activated proteins» (MAP) kinases (Bedard et Krause, 2007 ; Di Meo *et al.*, 2016). De plus, les ERO peuvent avoir une influence sur les protéines possédant des liens disulfures, ces liens étant très sensibles au potentiel redox de la cellule. De cette façon, les ERO sont capables d'oxyder le glutathion (GSH) et les peroxyrédoxines (Prx), deux molécules antioxydantes (Bedard et Krause, 2007 ; Di Meo *et al.*, 2016). Enfin, les ERO étant capables d'activer le facteur de transcription induit par hypoxie (HIF), elles peuvent augmenter l'expression de facteurs pro-angiogéniques tel le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) (Pelicano *et al.*, 2004).

- Régulation des canaux calciques :

La modification de résidus cystéines sensibles à l'oxydation permet également aux ERO de réguler les canaux ioniques intracellulaires et de la membrane plasmique. Les ERO peuvent ainsi être à l'origine de perturbations de l'homéostasie calcique de la mitochondrie et du réticulum endoplasmique pouvant mener à la mort de la cellule (Bedard et Krause, 2007).



**Figure 1.3 Les différents rôles des ERO en fonction de leur concentration.** En conditions normales, les ERO sont présentes en petite quantité dans les cellules et ont des rôles dans la signalisation, la défense de l'hôte contre des pathogènes, la régulation génique et la régulation des canaux calciques. Si leur concentration diminue, toutes ces voies de signalisation seront donc perturbées, menant à un état débalancé de la cellule pouvant mener à l'apparition de maladies. Dans le cas contraire, si la concentration en ERO augmente au-delà d'un seuil critique, celles-ci vont créer des dommages à l'ADN, aux lipides et aux protéines, ce qui mènera la cellule à la mort par apoptose.

- Dommages à l'ADN :

Les ERO sont capables de compromettre la régulation du cycle cellulaire, conduisant ainsi à une prolifération incontrôlée caractéristique des tumeurs. Par exemple, une forte concentration de  $\text{NO}^\bullet$  a pour effet de prédisposer les cellules à la tumorigenèse par le biais de lésions à l'ADN combinées à l'inhibition des mécanismes de réparation et à l'activation des voies de prolifération (Kim *et al.*, 2001). À cause de leur métabolisme accru, les tumeurs produisent davantage d'ERO, surtout dans les mitochondries. Cette situation fait de l'ADN mitochondrial une "cible de choix" pour l'oxydation par les ERO. L'instabilité génétique qui en résulte pourrait être à l'origine de l'apparition de résistances aux divers agents cytotoxiques (Pelicano *et al.*, 2004).

En conclusion, en fonction de l'intensité et de la durée de l'exposition aux ERO, du type d'ERO produit et de leur localisation subcellulaire, leurs effets peuvent être bénéfiques pour la cellule ou mener à sa mort (Bedard et Krause, 2007 ; Di Meo *et al.*, 2016).

### 1.2.2 Les systèmes antioxydants

Afin de maintenir un état redox propice à la survie cellulaire, les cellules possèdent de nombreux systèmes antioxydants.

#### 1.2.2.1 Enzymes antioxydantes

Les enzymes capables de détoxifier les ERO sont souvent spécifiques à une espèce réactive et parfois également à un compartiment cellulaire. Parmi ces enzymes se trouvent les superoxyde dismutases (SOD), qui catalysent la conversion de l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet -}$ ) en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et en oxygène ( $O_2$ ) (Fig. 1.2). Les SOD existent en plusieurs isoformes selon leur localisation : Cu,Zn-SOD (codée par le gène SOD1) est un homodimère cytoplasmique et nucléaire possédant un atome de cuivre et un atome de zinc au sein de chaque monomère; Mn-SOD (codée par le gène SOD2) est un homotétramère mitochondrial contenant quatre atomes de manganèse nécessaires à son activité; et EC-SOD (codée par le gène SOD3) est une forme extracellulaire homotétramérique de Cu,Zn-SOD (Huang *et al.*, 2012).

Le peroxyde d'hydrogène ainsi formé peut être pris en charge par différents systèmes enzymatiques. La catalase est une enzyme capable de catalyser la dismutation du peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau grâce à quatre groupes hèmes b. La catalase est principalement localisée dans les peroxysomes mais peut également être retrouvée dans le cytoplasme. En plus de son activité catalytique principale sur  $H_2O_2$ , la catalase est capable d'agir sur le peroxydinitrite et l'oxyde nitrique (Glorieux *et al.*, 2015). L'élimination du peroxyde d'hydrogène peut aussi avoir lieu grâce au système de peroxyrédoxines/thiorédoxines (Prx/Trx). Les



peroxydases de type peroxyrédoxines réduisent l' $\text{H}_2\text{O}_2$  en eau en passant elles-mêmes dans un état oxydé. Pour revenir à un état réduit et pouvoir continuer leur action sur une nouvelle molécule d' $\text{H}_2\text{O}_2$ , les Prx utilisent les Trx comme cofacteur. Celles-ci seront à leur tour réduites par les thiorédoxines réductases (TrxR), grâce à un transfert d'électrons provenant du coenzyme nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH). Toutes ces réactions d'oxydoréduction ont lieu au niveau des groupements thiol des Prx, Trx et TrxR. Il existe différentes isoformes de Prx et Trx en fonction de leur localisation subcellulaire : Prx1, Prx2 et Prx6 sont cytosoliques, Prx3 est présente dans les mitochondries, Prx4 peut soit se trouver dans le réticulum endoplasmique et les lysosomes soit être sécrétée dans l'espace extracellulaire et Prx5 est située dans les peroxysomes, les mitochondries et le cytosol (Espinosa-Diez *et al.*, 2015 ; Rhee *et al.*, 2001). En ce qui concerne les Trx, Trx1 est cytosolique et peut être sécrétée dans l'espace extracellulaire et Trx2 est mitochondriale. Il existe deux formes principales de TrxR : une forme cytosolique TrxR1 et une forme mitochondriale TrxR2 (Espinosa-Diez *et al.*, 2015 ; Lu et Holmgren, 2014). Des couples Prx/Trx/TrxR différents sont donc formés dans chacun de ces compartiments.

L'hème oxygénase 1 (HO-1) permet la dégradation des hèmes lors d'une réaction produisant du monoxyde de carbone (CO), du fer et de la biliverdine. Les hèmes peuvent eux-mêmes avoir une activité antioxydante, mais ne pouvant pas être régénérés, ils doivent être détruits par la cellule. La biliverdine ainsi produite sera transformée en bilirubine par la biliverdine réductase. La bilirubine est connue pour son activité antioxydante, son oxydation menant à la reformation de biliverdine dans le cadre d'un cycle redox permettant l'élimination de radicaux peroxydes issus de l'oxydation de substrats organiques (Kikuchi *et al.*, 2005).

Les enzymes NAD(P)H :quinone oxydoréductase 1 (NQO1) et NRH :quinone oxydoréductase 2 (NQO2) sont des flavoprotéines pouvant catalyser la réduction de nombreux substrats, notamment des quinones. La réduction des quinones permet

d'éviter la formation de semiquinones réactives qui pourraient mener à l'apparition d'ERO (Niture *et al.*, 2014 ; Ross et Siegel, 2004).

#### 1.2.2.2 Molécules antioxydantes

Le système antioxydant impliquant le glutathion est également utilisé pour éliminer le peroxyde d'hydrogène. La molécule de glutathion réduite (GSH) va accepter des électrons de l' $H_2O_2$  par l'intermédiaire de l'enzyme glutathion peroxydase (GPx). Le peroxyde d'hydrogène est alors transformé en deux molécules d'eau et le glutathion passe sous forme oxydée (GSSG). Pour régénérer la forme réduite du glutathion et donc pouvoir continuer la détoxification de l' $H_2O_2$ , l'enzyme glutathion réductase va utiliser des électrons en provenance du NADPH (Cardenas-Rodriguez *et al.*, 2014 ; Espinosa-Diez *et al.*, 2015).

Les vitamines C et E sont également des molécules antioxydantes. De par sa nature lipidique, la vitamine E agit au sein même des membranes lipidiques afin de détruire les radicaux hydroxyles, avant qu'ils ne puissent oxyder les acides gras, ainsi que les radicaux lipidiques (Rodrigo *et al.*, 2007). La vitamine C, qui est hydrosoluble, va agir au niveau du cytosol. Tout comme le glutathion, la vitamine C peut passer d'un état réduit (ascorbate) à un état oxydé (acide déhydroascorbique) afin de réduire des molécules oxydantes grâce à un transfert d'électrons. La vitamine C oxydée ainsi produite pourra alors être retransformée en ascorbate pour continuer la détoxification de la cellule (Rodrigo *et al.*, 2007).

Parmi les autres molécules antioxydantes, on notera les caroténoïdes (également liposolubles) et des métaux tel le sélénium (Rodrigo *et al.*, 2007).

### 1.3 La voie de signalisation de Nrf2

La voie de signalisation du «nuclear factor erythroid 2-related factor 2» (Nrf2) peut être activée dans les cellules en réponse à une augmentation des niveaux de ERO afin de permettre l'augmentation de la transcription des gènes codant pour de nombreux antioxydants.

#### 1.3.1 Activation et mode d'action

Nrf2 fait partie de la famille de protéines cap'n'collar (CNC), qui comprend quatre membres : Nrf1, Nrf2, Nrf3 et NF-E2. Nrf1, qui est essentiel pour le développement embryonnaire, ainsi que Nrf2, sont exprimés de façon ubiquitaire alors que Nrf3 s'exprime principalement dans le placenta ainsi qu'au niveau des acteurs du système immunitaire, tout comme NF-E2 (Hahn *et al.*, 2015 ; Niture *et al.*, 2014).

En conditions normales, le facteur de transcription Nrf2 est associé à la protéine «Kelch ECH associated protein 1» (Keap1), aussi appelée INrf2 de par sa fonction d'inhibition de Nrf2. En effet, lorsqu'il est associé à Keap1 et à culline-3 (CUL3), une ubiquitine-protéine ligase, Nrf2 va être polyubiquitiné et "envoyé" au protéasome pour dégradation. Sous certaines conditions de stress, comme par exemple le stress oxydatif ou électrophile (Niture *et al.*, 2014 ; O'Connell et Hayes, 2015), l'exposition à des xénobiotiques (Geismann *et al.*, 2014), la privation énergétique (Bocci et Valacchi, 2015) ou encore les lésions liées à l'ischémie/reperfusion (Cominacini *et al.*, 2015), Nrf2 sera libéré de Keap1 et pourra alors activer la transcription de ses gènes cibles dans le noyau (Kansanen *et al.*, 2013).

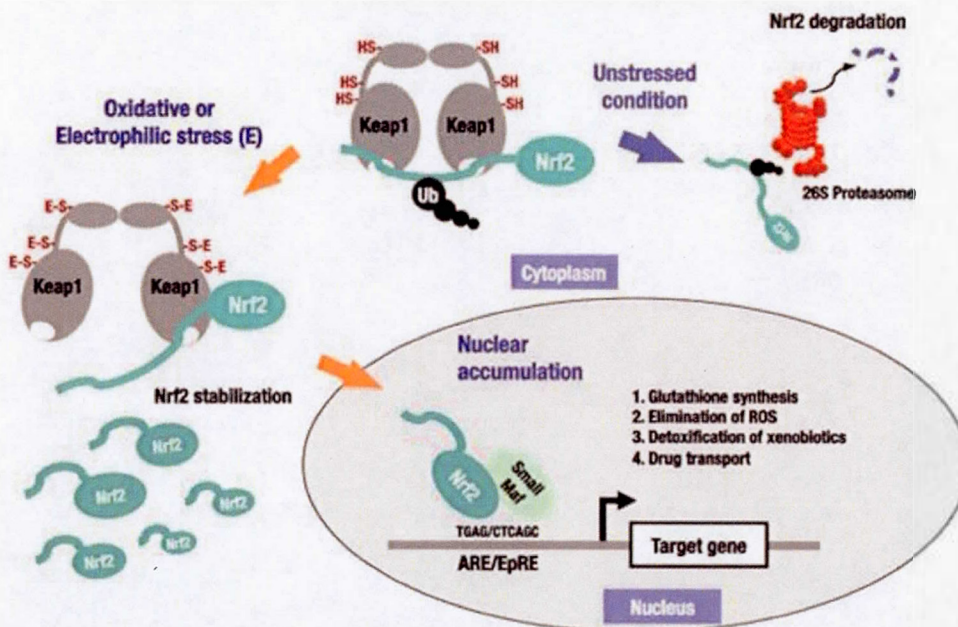
Keap1 est une protéine homodimérique très riche en cystéines, plusieurs d'entre elles pouvant être modifiées *in vitro* par différents oxydants et électrophiles (Fig. 1.4). Il a été prouvé que la modification de trois de ces résidus est capable

d'altérer la conformation de Keap1 de façon à libérer Nrf2 afin qu'il puisse transloquer au noyau et jouer son rôle de facteur de transcription (Kansanen *et al.*, 2013 ; Niture *et al.*, 2014). Le mécanisme exact par lequel la modification de ces cystéines aboutit à la libération de Nrf2 n'est pas connu, mais on suppose que la modification de résidus thiols sur Keap1 serait en jeu, par exemple en perturbant l'alignement des résidus lysines de Nrf2 qui ne pourraient donc plus être polyubiquitinés (Kansanen *et al.*, 2013). Une fois Keap1 inactivée, la sérine 40 de Nrf2 va être phosphorylée par une protéine kinase C (PKC), permettant ainsi à Nrf2 de se libérer et de rejoindre le noyau afin de se lier aux éléments de réponse aux antioxydants (ARE) présents en amont de ses gènes cibles (Niture *et al.*, 2014).

Afin de pouvoir se lier aux ARE, Nrf2 s'hétérodimérise avec des petites protéines Maf au niveau de son domaine en glissière à leucine («leucine zipper») (Niture *et al.*, 2014). Les petites protéines Maf (MafF, MafG et MafK) possèdent elles aussi un domaine en glissière à leucine par lequel elles interagissent avec Nrf2, ainsi qu'un domaine de liaison à l'ADN. Leur expression est augmentée par différents stimuli, notamment les métaux lourds, le stress oxydatif et les chocs thermiques (Blank, 2008 ; Suzuki *et al.*, 2001).



## Keap1-Nrf2 Regulation System



**Figure 1.4** Le système de régulation de Nrf2/Keap1 en conditions normales et en conditions de stress (adapté de (Kobayashi et Yamamoto, 2005)). En conditions normales, la protéine dimérique Keap1 est associée à Nrf2, entraînant son ubiquitination et donc sa dégradation par le protéasome. En conditions de stress, des résidus cystéines sur Keap1 sont modifiés, ce qui permet la libération et la stabilisation de Nrf2, qui peut alors atteindre le noyau. Nrf2 s'associe ensuite à des petites protéines Maf afin de se lier aux régions ARE du promoteur de ses gènes cibles. Ces gènes codent pour des protéines de réponse aux stress qui vont permettre de retourner à un état d'homéostasie cellulaire.

Les gènes ayant été identifiés comme des cibles de Nrf2 sont plusieurs centaines à ce jour, et codent pour la plupart pour des enzymes antioxydantes telles que NQO1 et NQO2, HO-1, SOD (Carmona-Aparicio *et al.*, 2015), catalase (Girnun *et al.*, 2002), Trx et TrxR (Mitsuishi *et al.*, 2012), et les enzymes glutamate-cystéine ligase (GCL, anciennement  $\gamma$ -GCS) et glutathion S-transférase (GST), impliquées dans le métabolisme du GSH (Kansanen *et al.*, 2013 ; Niture *et al.*, 2014). Les autres

protéines codées par des gènes cibles de Nrf2 ont un rôle dans des voies aussi variées que la métabolisation et le transport des médicaments, la voie des pentoses phosphates, le métabolisme du glucose ou encore l'apoptose (Niture *et al.*, 2014 ; Suzuki et Yamamoto, 2015).

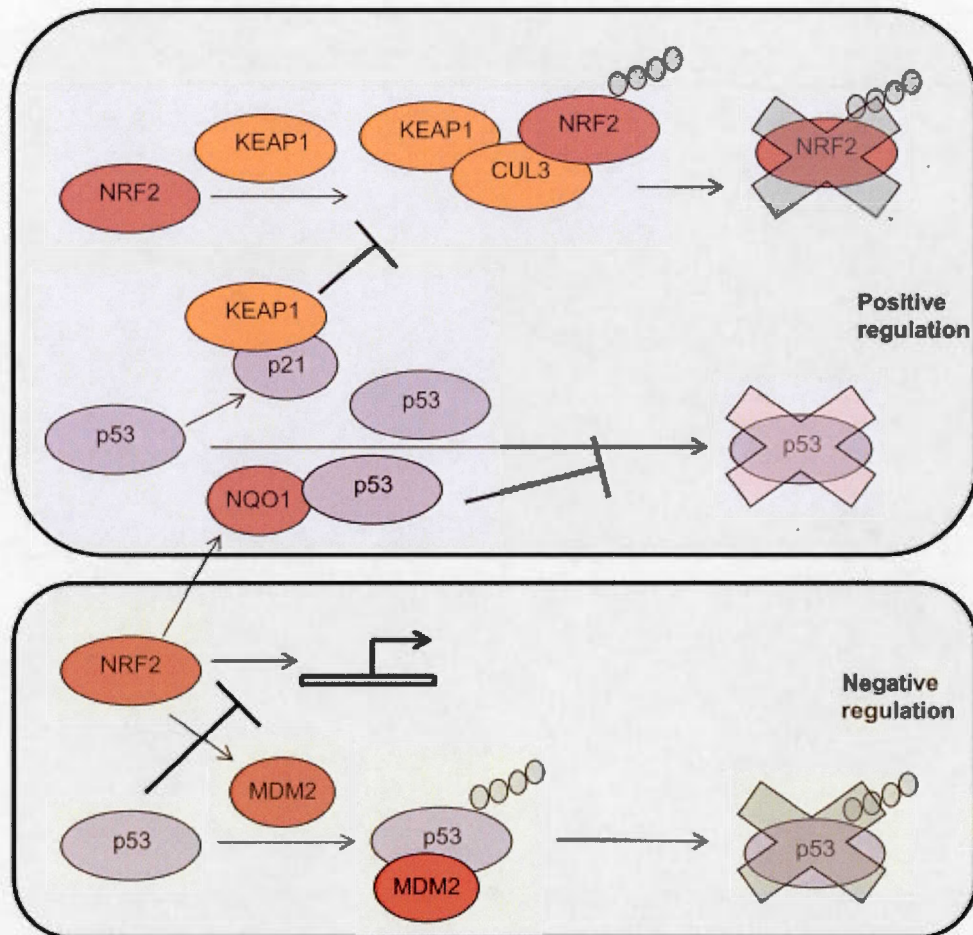
Une fois le stimulus de départ contrôlé et l'homéostasie rétablie dans les cellules, l'activation de Nrf2 est inhibée. Pour se faire la cellule va synthétiser les inhibiteurs de Nrf2 Keap1, Fyn et Bach1. Les trois vont s'exporter dans le noyau afin d'y contrer les effets de Nrf2; Keap1 en s'associant à Nrf2 pour provoquer son ubiquitination et donc sa dégradation et Fyn à travers la phosphorylation d'un résidu tyrosine sur Nrf2 qui mènera également à son ubiquitination et sa dégradation. Enfin, Bach1 étant lui aussi capable de former des hétérodimères avec les petites protéines Maf, il va entrer en compétition avec Nrf2 pour les sites de liaisons aux ARE et donc arrêter la transcription Nrf2-dépendante (Niture *et al.*, 2014). De même, si le stress (oxydatif ou autre) devient trop important et que la cellule ne peut être sauvée, l'expression de Nrf2 sera diminuée, notamment par p53, et la cellule entrera en apoptose (Chen *et al.*, 2012).

### 1.3.2 Modulateurs

Afin de répondre aux besoins de la cellule, diverses molécules sont capables d'activer ou inhiber la voie de Nrf2. Le modulateur principal de la voie Nrf2 est p53 (Fig. 1.5). La protéine p53, surnommée la «gardienne du génome», a pour rôle principal d'arrêter le cycle cellulaire afin de procéder à des réparations lors de dommages à l'ADN et de mener la cellule à l'apoptose en cas de dommages irréparables (Pallepati et Averill-Bates, 2011c). p53 est connue pour promouvoir la survie de la cellule en cas de stress modéré, notamment en protégeant la cellule et son génome contre les ERO. En conditions physiologiques, la protéine p53 nucléaire induit l'expression de la protéine «mouse double-minute 2» (MDM2) qui va se lier à p53 et entraîner son ubiquitination et donc sa dégradation par le protéasome afin de

maintenir un bas niveau de p53. En cas de stress (dommages à l'ADN, ERO, hypoxie...), p53 sera stabilisée par phosphorylation, acétylation ou méthylation et l'inhibition de p53 par MDM2 sera interrompue, menant à une accumulation de p53 dans le cytosol et dans le noyau (Chaabane *et al.*, 2013 ; Palapati et Averill-Bates, 2011c). p53 va alors inhiber la prolifération cellulaire, notamment via l'activation de p21 (Valente *et al.*, 2013). p21 est un inhibiteur des kinases cycline-dépendantes (CDK) qui, de par son action sur des complexes CDK au niveau du cycle cellulaire, peut provoquer l'arrêt du cycle et l'entrée de la cellule en sénescence ou en apoptose. En activant p21, p53 peut donc déclencher l'arrêt du cycle cellulaire et induire l'apoptose afin d'éliminer la cellule endommagée et donc empêcher sa transformation maligne (Chen *et al.*, 2012 ; Fan *et al.*, 2014).

p53 est capable de moduler l'expression de Nrf2 selon deux phases : une phase d'induction en cas de stress modéré et une phase de répression en cas de stress intense. Le mécanisme de régulation de Nrf2 par p53 est complexe. D'un côté, p21, dont l'expression est modulée par p53, peut s'associer à Nrf2 et empêcher sa liaison avec Keap1, bloquant ainsi son ubiquitination et sa dégradation (Chen *et al.*, 2012 ; Kansanen *et al.*, 2013 ; Rotblat *et al.*, 2012 ; Tung *et al.*, 2015). De l'autre côté, NQO1, dont l'expression est modulée par Nrf2, peut s'associer à p53 pour prévenir sa dégradation (Rotblat *et al.*, 2012 ; Tung *et al.*, 2015). On parle alors de régulation positive des deux protéines, qu'on appellera la phase d'induction.



**Figure 1.5 Co-régulation positive et négative entre Nrf2 et p53** (tiré de (Rotblat *et al.*, 2012)). En conditions physiologiques normales, Keap1, en complexe avec CUL3, va s'associer à Nrf2 et provoquer sa dégradation par le protéasome. Afin de maintenir un niveau physiologique bas de p53, celui-ci va également être dégradé par le protéasome. De plus, p21, l'une des cibles de p53, peut s'associer à Keap1 afin de libérer Nrf2 et empêcher sa dégradation. De même, NQO1, l'une des cibles de Nrf2, peut s'associer à p53 et empêcher sa dégradation. Ces mécanismes constituent la régulation positive entre Nrf2 et p53. Dans le cas contraire, MDM2, gène cible de Nrf2, peut entraîner la dégradation de p53 tandis que p53 peut agir comme répresseur transcriptionnel de Nrf2.



En revanche, Nrf2 peut également promouvoir l'expression de MDM2, un régulateur négatif de p53 qui mènera à sa destruction, et p53 peut perturber l'activation de gènes cibles de Nrf2 en interagissant avec les ARE de ces gènes (Rotblat *et al.*, 2012 ; Tung *et al.*, 2015). Il s'agit alors de régulation négative entre les deux protéines, appelée phase de répression. En résumé, dans le cas d'un stress modéré, des niveaux normaux de p53 et p21 vont permettre l'expression de gènes pro-survie tels que Nrf2 alors que dans un cas de stress intense une expression de p53 accrue pourrait mener à la répression des gènes cibles de Nrf2 et à l'activation des processus apoptotiques (Chen *et al.*, 2012 ; Das et Vinayak, 2015).

La protéine p62, qui facilite la dégradation des agrégats protéiques lors de l'autophagie, peut provoquer l'agrégation de Keap1, permettant ainsi la libération de Nrf2 (Kansanen *et al.*, 2013 ; Niture *et al.*, 2014). p62 est à la fois une cible et un activateur de Nrf2, formant ainsi une boucle de rétroaction positive. L'activation de Nrf2 est donc possible suite à celle de p62 par l'autophagie (Itoh *et al.*, 2015).

### 1.3.3 Nrf2 et cancer

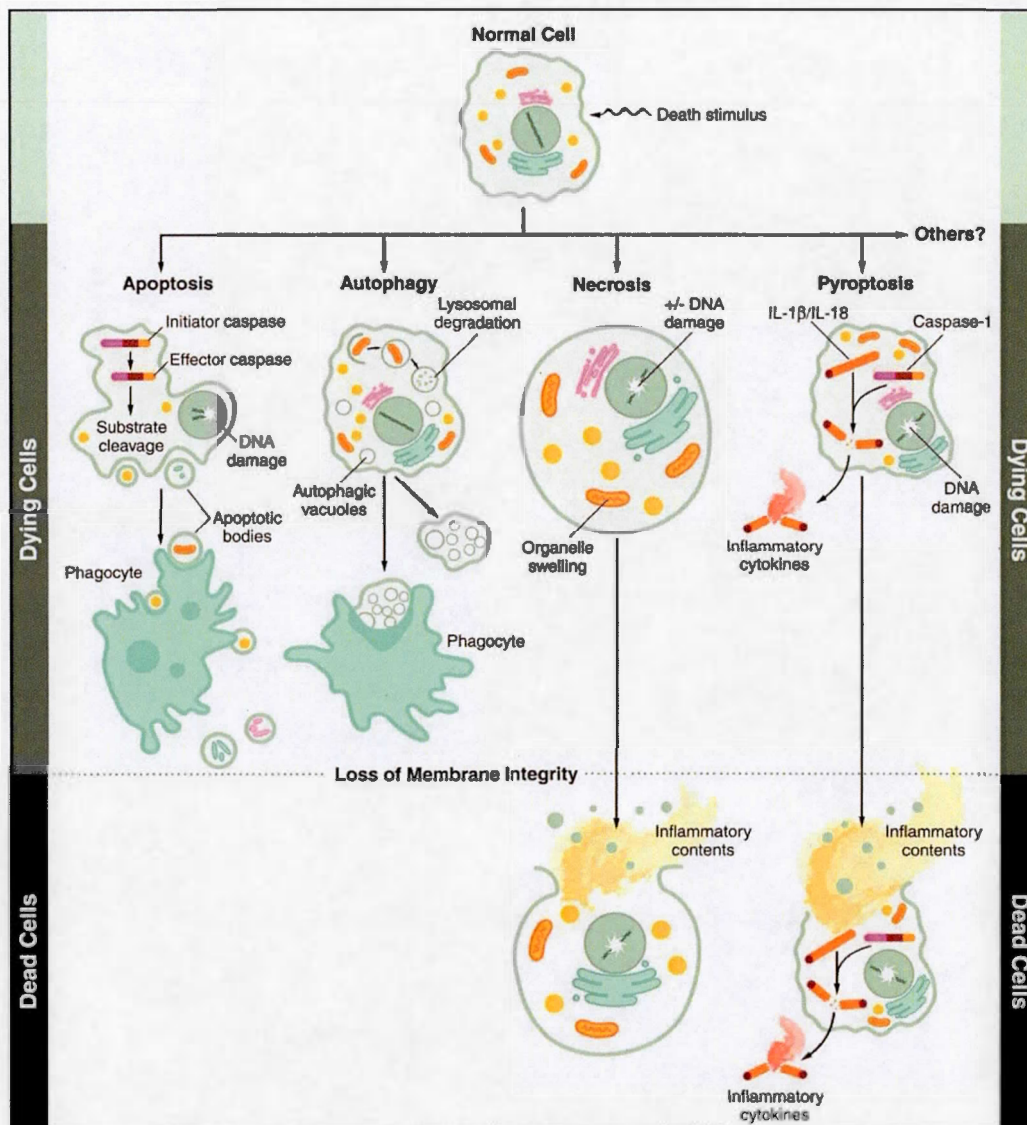
Selon différentes études, Nrf2 possède à la fois un rôle de suppresseur de tumeur et un rôle d'oncogène. En faveur de son rôle anti-tumoral, il faut noter que la capacité de Nrf2 à réduire le niveau d'ERO dans les cellules permet de diminuer une source de mutations et donc d'instabilité génomique. De plus, Nrf2 a été reporté comme étant réprimé par les oncogènes et activé par les suppresseurs de tumeur (Niture *et al.*, 2014). Concernant son rôle d'oncogène, il a été prouvé que les oncogènes K-Ras, B-Raf et Myc peuvent activer la transcription de Nrf2 dans les cellules cancéreuses. Nrf2 peut réguler à la hausse la transcription de plusieurs enzymes liées au métabolisme du glucose, augmentant ainsi la production d'énergie et incitant à la prolifération cellulaire (Niture *et al.*, 2014). Il a également été montré que de nombreux cancers surexpriment Nrf2 à cause de mutations au niveau des gènes codants pour Keap1 et Nrf2, empêchant leur association et donc la dégradation de

Nrf2 (Niture *et al.*, 2014 ; Rotblat *et al.*, 2012). Enfin, Nrf2 est capable de réguler à la hausse l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL, ce qui le cas échéant peut contribuer à la survie des cellules cancéreuses (Niture *et al.*, 2014). On peut donc conclure que dans un contexte «normal», lorsque l'expression de Nrf2 est adéquatement régulée, Nrf2 est essentiel à la survie de la cellule, mais qu'en cas de dérégulations dues à des mutations dans sa séquence ou à la modification des protéines qui régulent son expression, il peut devenir oncogène. Cette définition fait de Nrf2 un facteur proto-oncogène (Niture *et al.*, 2014).

De plus, les cellules cancéreuses qui sont déficientes en p53 présentent une diminution de l'induction des gènes cibles de Nrf2, ce qui suggère que p53 joue un rôle important dans l'activation de Nrf2 dans les cellules cancéreuses (Das et Vinayak, 2015 ; Rotblat *et al.*, 2012).

#### 1.4 Mort cellulaire

La mort cellulaire est un mécanisme essentiel à la survie d'un organisme. Que ce soit pour aider au développement d'un tissu, éliminer les cellules surnuméraires, trop vieilles ou endommagées, il existe de nombreux mécanismes pouvant mener à la mort des cellules. Parmi ces mécanismes, les deux plus étudiés sont la nécrose et l'apoptose; mais il existe également de nombreuses autres voies qui gagnent de plus en plus d'attention.



**Figure 1.6 Voies de mort cellulaire** (adapté de (Fink et Cookson, 2005)). Après réception d'un stimulus de mort, les cellules peuvent mettre en place différentes voies de mort: entre autres, l'apoptose (mort programmée menant au démantèlement de la cellule en corps apoptotiques qui seront détruits par phagocytose), l'autophagie (formation de vacuoles et dégradation du contenu cellulaire par digestion acide), la nécrose (gonflement de la cellule jusqu'à rupture de la membrane provoquant une réaction inflammatoire) et la pyroptose (destruction de la cellule suite à une réaction immunitaire provoquant la production de molécules pro-inflammatoires).

### 1.4.1 Nécrose

La nécrose est une mort cellulaire non-programmée, initialisée par des facteurs physicochimiques externes tels que le manque d'oxygène, la chaleur, l'acidification, le choc osmotique, les stress mécaniques et les cycles de congélation/décongélation (Belizario *et al.*, 2015), ainsi que par l'échec du maintien de l'homéostasie dû à la perturbation des voies de régulation du transport des ions, de production d'énergie et de maintien du pH (Jin et El-Deiry, 2005). Elle est caractérisée par un gonflement des organelles et de la cellule, ainsi qu'un démantèlement de la membrane plasmique menant à la libération dans le milieu du contenu cellulaire ce qui aura pour conséquence d'activer une réponse immunitaire inflammatoire (Fig. 1.6) (Chaabane *et al.*, 2013 ; Negroni *et al.*, 2015 ; Nikolettópoulou *et al.*, 2013). Ces événements peuvent être liés à un épuisement des réserves en énergie (ATP) de la cellule, à une augmentation de la concentration cytosolique en calcium, à une production élevée en radicaux libres menant à l'oxydation des lipides de la membrane et à des dommages structurels importants au niveau de l'ADN et des protéines (Belizario *et al.*, 2015). La nécrose et l'apoptose ont certains inducteurs en commun, comme par exemple le stress oxydatif. Le passage d'un type de mort cellulaire à un autre dépend alors de l'intensité du stress. Le passage de l'apoptose à la nécrose se fera suite à l'inactivation des caspases ou à un épuisement des niveaux d'ATP (Pallepati et Averill-Bates, 2011c).

### 1.4.2 Apoptose

#### 1.4.2.1 Introduction

L'apoptose constitue le principal type de mort cellulaire programmée. Elle peut se produire chez des cellules saines au cours de l'embryogenèse ou pour le maintien de l'homéostasie tissulaire, chez des cellules malades ou endommagées, ou encore pour éliminer les cellules immunitaires en surnombre après l'élimination d'un pathogène (Chaabane *et al.*, 2013 ; Negroni *et al.*, 2015). Elle peut être activée par



des signaux aussi variés que des dommages à l'ADN, un manque de facteurs de croissance ou de nutriments ou encore des stress variés (thermique, oxydatif...) (Jin et El-Deiry, 2005 ; Negroni *et al.*, 2015). Sa régulation est cruciale : une apoptose excessive des neurones est associée à la maladie de Parkinson et à celle d'Alzheimer, tandis qu'un défaut d'apoptose contribue à l'inflammation chronique et au développement de tumeurs (Pallepati et Averill-Bates, 2011c).

Il existe trois voies principales d'activation de l'apoptose : une voie extrinsèque via les récepteurs de mort et deux voies intrinsèques via le réticulum endoplasmique (RE) et la mitochondrie. Les caractéristiques physiques de l'apoptose, communes à ces trois voies, incluent la condensation de la chromatine, la perte d'adhésion, le rétrécissement de la cellule et le bourgeonnement de la membrane. Ce bourgeonnement est un précurseur à la formation de corps apoptotiques, c'est-à-dire de « morceaux » de cellule entourés de membrane plasmique. Ces membranes ont la particularité d'exposer des phosphatidylsérines à leur surface, des phospholipides qui sont habituellement exprimés sur la face interne de la membrane plasmique. Ces phosphatidylsérines vont permettre d'attirer les macrophages pour que la cellule soit éliminée par phagocytose (Fig. 1.6). De cette façon, le contenu cellulaire n'étant jamais libéré dans le milieu, l'apoptose ne provoque pas de réaction inflammatoire (Chaabane *et al.*, 2013).

La caractéristique moléculaire principale de l'apoptose est son utilisation quasi-systématique de protéases à cystéine nommées caspases (Belizario *et al.*, 2015). Ces protéases sont synthétisées sous forme de zymogènes (ou proenzymes) inactifs, qui devront être clivés pour devenir actifs. Les caspases clivent leurs substrats au niveau de résidus d'aspartate. Elles sont divisées en deux groupes selon leur fonction : le premier regroupe les caspases inflammatoires (caspase-1, -4, -5, -11, -12, -13 et -14) et le deuxième comprend les caspases apoptotiques (caspase-2, -3, -6, -7, -8, -9 et -10). Il est à noter que les caspases-4 et -12 ont également une activité apoptotique,



en plus de leur rôle dans l'inflammation (Jin et El-Deiry, 2005 ; Pallepati et Averill-Bates, 2011c). Parmi les caspases apoptotiques on trouve des caspases initiateuses qui contiennent soit un domaine effecteur de mort (DED) comme les caspases-8 et -10, soit un domaine de recrutement et d'activation des caspases (CARD) comme les caspases-2 et -9. Ces domaines vont permettre l'interaction de ces caspases avec les signaux d'activation de l'apoptose. Les caspases initiateuses peuvent s'auto-activer selon le modèle de dimérisation induite par la proximité. Selon ce modèle, le recrutement des caspases via leurs domaines DED ou CARD entraîne leur concentration et augmente donc leur possibilité d'homodimérisation et d'auto-activation (Jin et El-Deiry, 2005). Les caspases effectrices (caspase-3, -6 et -7) sont activées par des caspases initiateuses; la caspase-3 a été reconnue comme étant la plus importante des caspases effectrices, les caspases-6 et -7 ayant des rôles redondants dans la plupart des voies apoptotiques (Belizario *et al.*, 2015 ; Jin et El-Deiry, 2005).

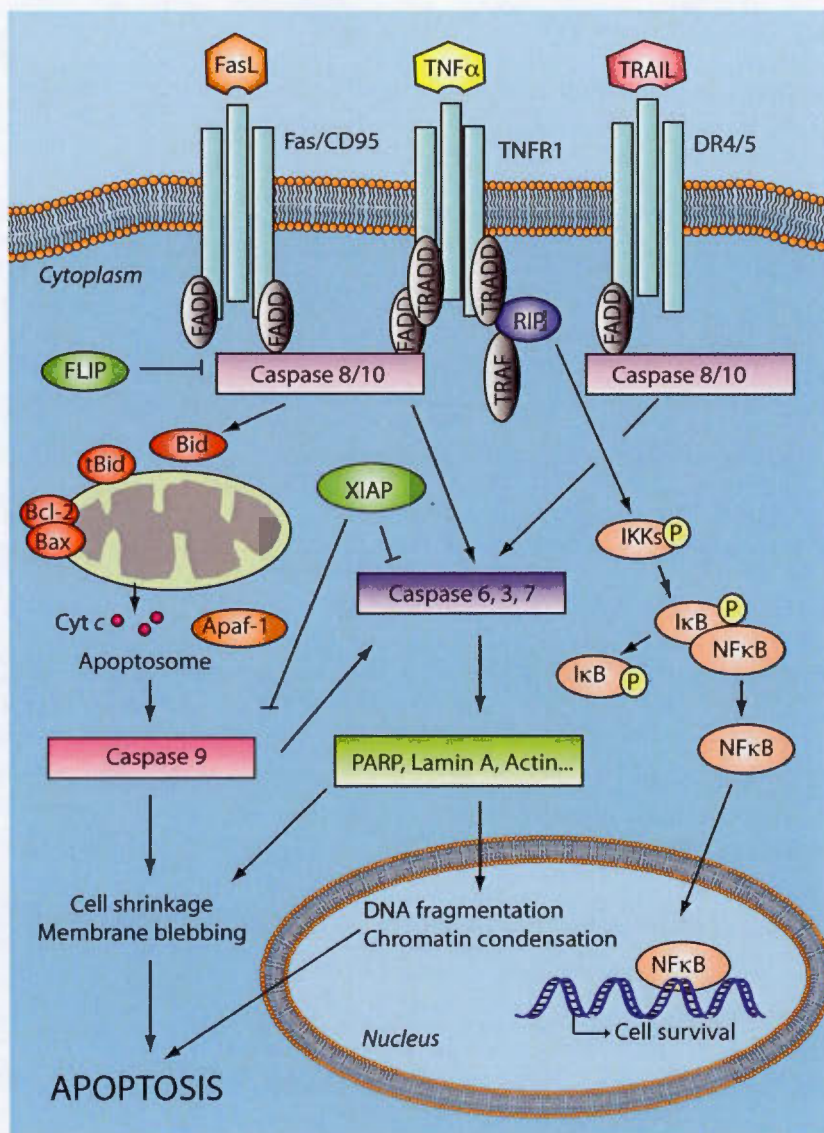
Ces caspases sont à l'origine des caractéristiques physiques de l'apoptose via le clivage de nombreux substrats, tels des médiateurs et régulateurs de l'apoptose, des protéines de structure, des protéines de réparation de l'ADN et des protéines liées au cycle cellulaire (Jin et El-Deiry, 2005). ICAD, la sous-unité inhibitrice de la DNase activée par les caspases (CAD), un facteur de fragmentation de l'ADN, pourra être clivée par l'une des trois caspases effectrices, libérant alors CAD qui pourra migrer au noyau pour exercer son activité protéasique. L'enzyme de réparation de l'ADN poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) est également une des cibles des caspases. Son activité nécessitant beaucoup d'ATP, son clivage va permettre de rediriger cet ATP vers les processus apoptotiques. Les caspases peuvent également endommager les filaments d'actine, les lamines nucléaires, les filaments intermédiaires ainsi que des protéines d'adhérence. Suite à ces clivages la cellule va perdre sa forme et se détacher de la matrice et des cellules environnantes (Jin et El-Deiry, 2005). Enfin, le clivage de régulateurs du cycle cellulaire, tels p21 et MDM2, serait un mécanisme antitumoral pour permettre d'éliminer les régulateurs qui ont été corrompus lors du

développement de la tumeur et donc permettre l'arrêt du cycle cellulaire et la mort de la cellule par apoptose (Jin et El-Deiry, 2005 ; Pallepati et Averill-Bates, 2011c).

#### 1.4.2.2 Voie des récepteurs de mort

Cette voie, aussi appelée voie extrinsèque, est activée par la liaison de ligands spécifiques à des récepteurs transmembranaires appelés récepteurs de mort. Ils font partie de la superfamille des récepteurs des facteurs de nécrose tumorale (TNFR) (Jin et El-Deiry, 2005). Les plus connus sont : Fas (CD95/APO-1), TNFR1, et les récepteurs des ligands TRAIL (TRAIL-R1/DR4 et TRAIL-R2/DR5). Leurs ligands sont, respectivement, FasL, TNF et TRAIL. Lorsque le ligand se fixe à son récepteur, les domaines de mort (DD) cytoplasmiques de ces récepteurs vont attirer des molécules adaptatrices qui formeront un complexe de signalisation induisant la mort (DISC) (Jin et El-Deiry, 2005). Dans le cas du couple TNF/TNFR1, les molécules adaptatrices domaine de mort associé à Fas (FADD) et domaine de mort associé au récepteur TNF (TRADD) seront recrutées via des interactions entre leurs domaines DD respectifs (Fig. 1.7). Dans le cas de FasL et TRAIL, seule FADD sera recrutée (Jin et El-Deiry, 2005). Ces molécules adaptatrices vont interagir avec les procaspases-8 et -10 grâce à leur domaine DED (Jin et El-Deiry, 2005). Suite à leur homodimérisation, les procaspases-8 et -10 s'auto-activent. Les caspases-8 et -10 ainsi formées seront alors capables d'activer les caspases effectrices -3, -6 et -7 (Belizario *et al.*, 2015 ; Jin et El-Deiry, 2005). La protéine c-FLIP est également capable de se lier à la procaspase-8 via son domaine DED, empêchant ainsi la cascade de caspases (Belizario *et al.*, 2015 ; Jin et El-Deiry, 2005). Mais c-FLIP peut aussi être une cible des caspases afin d'inhiber cette voie de survie et permettre aux récepteurs de mort d'exercer leur activité pro-apoptotique. Il est bon de noter que contrairement à Fas et TRAIL, TNFR1 n'induit pas la mort cellulaire de façon spontanée : en effet, TNFR1 est capable d'activer la voie de survie du facteur nucléaire- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) qui peut activer les facteurs anti-apoptotiques c-FLIP, Bcl-xL, MnSOD et plusieurs protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP) (Jin et El-Deiry, 2005 ;

Pallepati et Averill-Bates, 2011c). Il existe également un lien entre la voie des récepteurs de mort et la voie mitochondriale : en effet, la caspase-8 peut cliver la protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2 Bid, directement ou à travers le clivage de la caspase-2, menant à son activation et sa translocation à la mitochondrie (Jin et El-Deiry, 2005 ; Pallepati et Averill-Bates, 2011c). t-Bid, la forme clivée de Bid, pourra alors s'associer avec les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak afin d'induire la perméabilisation de la membrane mitochondriale et la sortie de molécules pro-apoptotiques tels que le cytochrome c (Pallepati et Averill-Bates, 2011c).



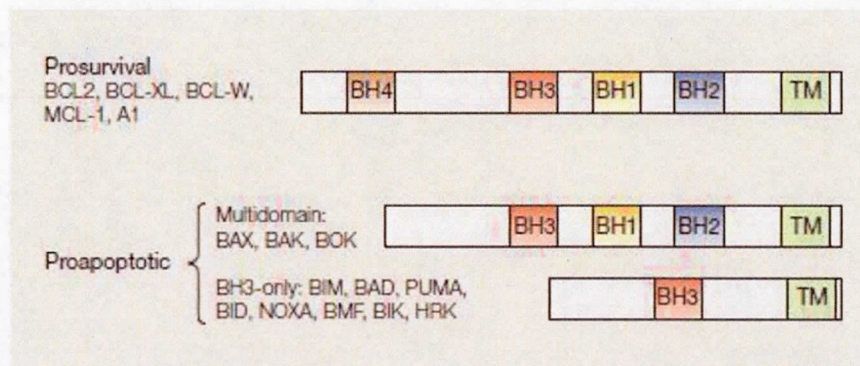
**Figure 1.7 Voie extrinsèque de l'apoptose** (tiré de (Krakstad et Chekenya, 2010)). La voie des récepteurs de mort est activée par la liaison des ligands TNF, FasL et TRAIL à leur récepteur TNFR1, Fas et DR4/5, respectivement. Cette liaison permet le recrutement des molécules adaptatrices FADD et TRADD qui vont participer à l'activation des caspases-8 et -10. Ces caspases pourront alors soit directement déclencher une cascade de caspases en activant les caspases-3, -6 et -7, soit cliver Bid en t-Bid et ainsi activer la voie intrinsèque de la mitochondrie qui mènera également à l'activation de ces trois caspases qui mèneront alors à l'apoptose. En l'absence de caspases-8 et -10, TNF/TNFR1 peuvent activer la voie de survie de NF- $\kappa$ B.



#### 1.4.2.3 Voie de la mitochondrie

La voie de la mitochondrie est régulée par les protéines de la famille «B-cell lymphoma protein 2» (Bcl-2), qui contrôlent la perméabilité de la membrane mitochondriale (Chaabane *et al.*, 2013 ; Nikolettou *et al.*, 2013). Il existe deux types de protéines dans la famille Bcl-2 : les anti-apoptotiques et les pro-apoptotiques. Les anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, A1 et Mcl-1) contiennent trois ou quatre domaines d'homologie à Bcl-2 (BH) nécessaires à leurs fonctions (Fig. 1.8). En effet, c'est grâce à ces domaines que ces protéines peuvent interagir avec les membres pro-apoptotiques de leur famille afin de les entraver. Parmi ces protéines pro-apoptotiques on trouve des protéines contenant plusieurs domaines BH (Bax et Bak) et des protéines ne contenant que le domaine BH3 (Bim, Bid, Bik, Bad, Noxa et Puma). Puma et Noxa sont induits par p53 suite à des dommages à l'ADN (Valente *et al.*, 2013). Puma pourra alors activer Bax et Bak et inhiber les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Les protéines Bak, Bcl-xL et Bcl-2 sont principalement présentes au niveau de la membrane externe de la mitochondrie, mais aussi au niveau du RE. En conditions normales, Bax, Bid et Bad sont localisées dans le cytosol. Les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 seront alors liées à Bax et Bak pour empêcher leur activité pro-apoptotique. En conditions d'induction de l'apoptose, Bid sera clivée en t-Bid par les caspases-2, -8 ou -10, Bax va s'oligomériser et Bad va être libérée de sa protéine adaptatrice 14-3-3. Ces trois molécules vont ensuite transloquer à la membrane externe de la mitochondrie (Fig. 1.9) (Pallepati et Averill-Bates, 2011c). Les protéines ne contenant que le domaine BH3 vont s'associer à Bcl-2 et Bcl-xL de façon à libérer Bax et Bak de leur emprise. Bax et Bak vont alors s'associer à t-Bid pour former des pores dans la membrane externe de la mitochondrie, menant à sa perméabilisation (Belizario *et al.*, 2015 ; Nikolettou *et al.*, 2013).

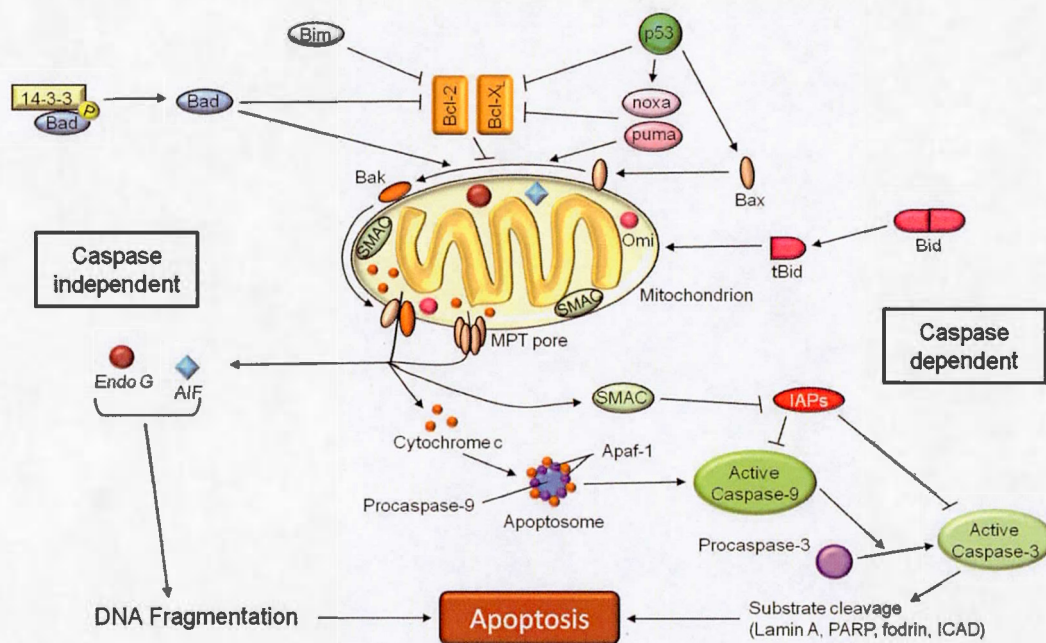




**Figure 1.8 La classification des protéines de la famille Bcl-2 selon leurs domaines BH** (tiré de (Geneste, 2014)). Toutes les protéines de la famille Bcl-2 possèdent des domaines d'homologie à Bcl-2 (BH). Les protéines anti-apoptotiques en ont quatre (de BH1 à BH4). Les protéines pro-apoptotiques sont divisées en deux catégories : celles qui possèdent plusieurs domaines et celles qui ne possèdent que le domaine BH3. Il est bon de noter que toutes les protéines «BH3-only» ne possèdent pas de domaine transmembranaire (TM) (par exemple Bad et Bid).

Suite à la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie (MOMP), la matrice mitochondriale va gonfler sous l'effet de l'osmose, menant à la rupture de la membrane externe (Pallepati et Averill-Bates, 2011c). Cet événement va permettre la libération dans le cytosol du cytochrome c (cyt c), habituellement localisé sur la face externe de la membrane interne de la mitochondrie. Il pourra alors se lier au facteur d'activation des protéases apoptotiques (Apaf1) afin de former l'apoptosome. Apaf1 va recruter la procaspase-9 grâce à son domaine CARD. La forte concentration de procaspase-9 au sein de l'apoptosome permet son homodimérisation et donc son activation en caspase-9, qui est la première d'une cascade de caspases dont font partie les caspases-3, -6 et -7 (Chaabane *et al.*, 2013 ; Jin et El-Deiry, 2005 ; Nikolettou *et al.*, 2013). La MOMP peut également permettre la libération du facteur d'induction de l'apoptose (AIF) et de l'EndoG, qui migreront alors dans le noyau afin d'initier la condensation et la fragmentation de la chromatine, ainsi que de la protéine SMAC/Diablo qui se lie à des IAP afin de les neutraliser (Belizario *et al.*,

2015 ; Chaabane *et al.*, 2013). L'induction de l'apoptose par AIF et EndoG sont parmi les seules voies apoptotiques ne passant pas par les caspases (Jin et El-Deiry, 2005 ; Pallepati et Averill-Bates, 2011c). Les IAP sont les principaux régulateurs négatifs des caspases (Jin et El-Deiry, 2005). Les protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xL et les IAP peuvent également être clivées par des caspases (Jin et El-Deiry, 2005).



**Figure 1.9 Voie de la mitochondrie (intrinsèque)** (adapté de (Pallepati et Averill-Bates, 2011c)). Les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 permettent d'inhiber les membres anti-apoptotiques de cette famille et vont s'associer entre eux pour créer des pores dans la membrane mitochondriale et mener à la sortie du cytochrome c. Le cyt c va former un complexe avec Apaf1 et la procaspase-9 afin de libérer une caspase-9 active qui pourra à son tour activer la caspase-3. La protéine SMAC va également sortir de la mitochondrie afin d'inhiber les IAP, tout comme les molécules AIF et EndoG qui vont directement fragmenter l'ADN sans avoir recours aux caspases.

#### 1.4.2.4 Voie du réticulum endoplasmique

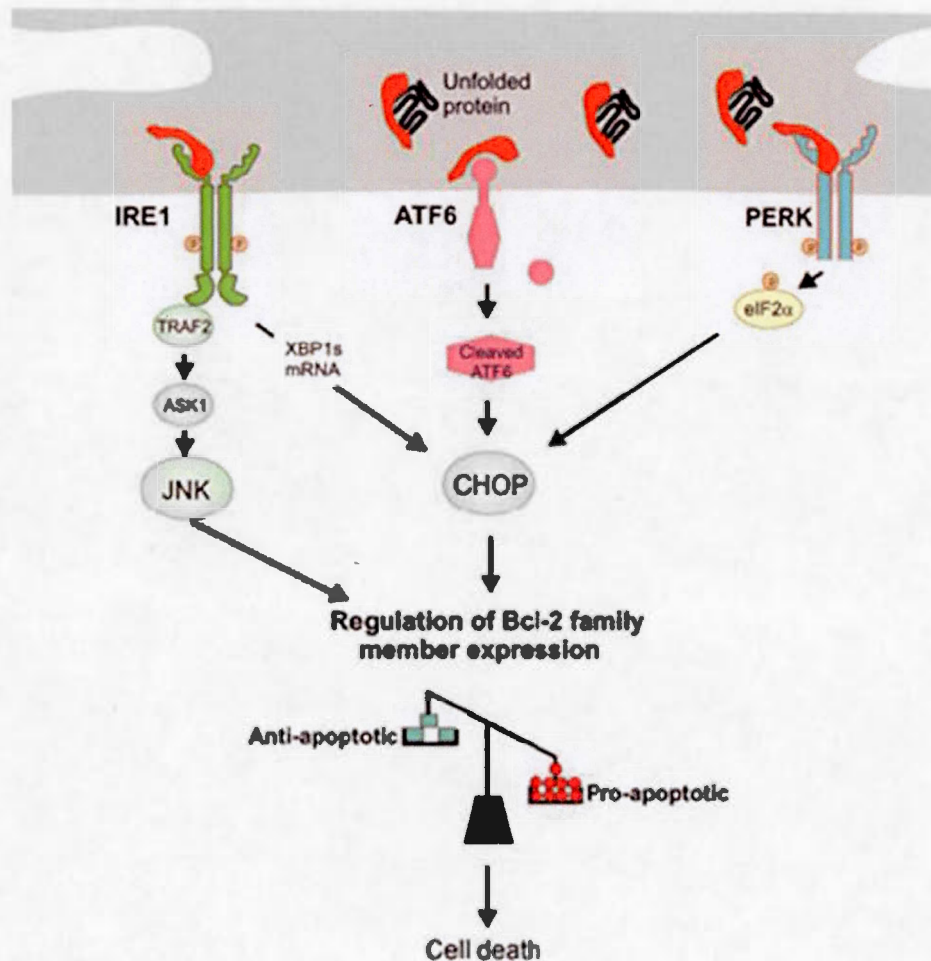
Le RE est impliqué dans la synthèse des lipides et le repliement et la maturation des protéines. En conditions de stress, comme par exemple un manque de nutriments, un déséquilibre des niveaux de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), l'hypoxie ou le stress oxydatif, les fonctions du RE peuvent être perturbées et mener à l'accumulation de protéines mal repliées. Ce phénomène est connu sous le nom de stress du RE. Il permet l'activation de nombreux mécanismes qui vont d'abord chercher à résoudre la situation via la réponse aux protéines mal repliées (UPR). Si les dommages sont trop importants, ces mêmes mécanismes vont mener à la mort de la cellule (Pallepati et Averill-Bates, 2011c). Ainsi, les voies du stress du RE gérées par la «protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase» (PERK), la protéine dépendante de l'inositol 1 (IRE1) et le facteur de transcription activateur-6 (ATF6) peuvent déclencher l'apoptose via l'activation de différentes molécules (Fig. 1.10).

IRE1 peut se lier à la protéine adaptatrice «TNF Receptor-Associated Factor-2» (TRAF-2) afin d'interagir avec la kinase régulant les signaux apoptotiques 1 (ASK-1) pour phosphoryler et activer les «c-Jun N-terminal kinases» (JNK). JNK sera alors capable d'inactiver par phosphorylation la protéine Bcl-2 présente au niveau de la membrane du RE, induisant ainsi sa dégradation. Les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak, qui étaient jusque-là inactivées par Bcl-2, vont former un pore dans la membrane du RE qui va entraîner la perte de l'homéostasie calcique. La sortie du calcium du RE risque de provoquer l'entrée de calcium dans la mitochondrie et donc l'apoptose par la voie mitochondriale. JNK peut également phosphoryler Bim, menant également à l'activation de Bax (Jin et El-Deiry, 2005 ; Pallepati et Averill-Bates, 2011c ; Sovolyova *et al.*, 2014).

Les voies initiées par ATF6, PERK et IRE1 peuvent toutes les trois activer la protéine homologue C-EBP (CHOP), un facteur de transcription qui peut inhiber la transcription de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et activer la transcription de la



protéine pro-apoptotique Bim (Jin et El-Deiry, 2005 ; Pallepati et Averill-Bates, 2011c ; Sovolyova *et al.*, 2014).



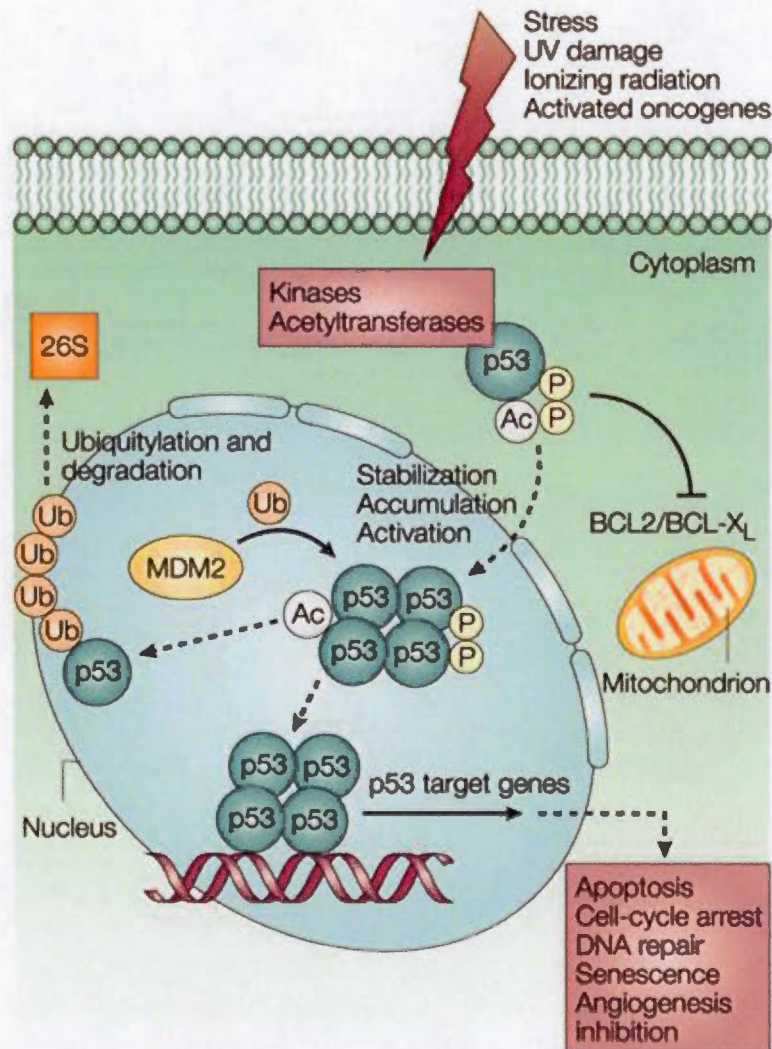
**Figure 1.10 Voie du réticulum endoplasmique** (adapté de (Sovolyova *et al.*, 2014)). L'accumulation de protéines mal repliées va activer les protéines IRE1, ATF6 et PERK qui vont mener à l'apoptose grâce à la modulation de l'expression des membres pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2.

Enfin, la caspase-7 est activée par le stress du RE et permet d'activer la caspase-12 via un complexe avec Bip. La libération du calcium du RE va permettre l'activation de la protéase dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  calpaïne, qui sera également à l'origine de l'activation de la caspase-12. Une cascade de caspases se mettra alors en place avec l'activation des caspases-9 et -3. Il est à noter que la plupart des cellules humaines ne possèdent qu'un gène incomplet pour la caspase-12. L'équivalent humain de la caspase-12 murine est la caspase-4 (Jin et El-Deiry, 2005 ; Pallepati et Averill-Bates, 2011c).

#### 1.4.2.5 Apoptose : rôle de p53

La protéine p53 joue un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et le déclenchement de l'apoptose (Fan *et al.*, 2014). En cas de dommages à l'ADN, p53 permet l'arrêt du cycle cellulaire pour permettre les réparations. Si ces dommages ne peuvent être réparés, p53 mènera la cellule à l'apoptose. Le gène p53 est la cible de mutation dans 50% des cancers, conduisant à la survie des cellules malgré d'importantes altérations au niveau de leur génome (Pallepati et Averill-Bates, 2011c). p53 existe sous une forme nucléaire et une forme cytosolique. En conditions physiologiques, l'expression de MDM2 induite par p53 nucléaire va mener à la dégradation de p53 afin d'en maintenir un bas niveau dans le noyau comme dans le cytosol. En cas de stress, MDM2 ne s'associe plus à p53, il y a donc accumulation de p53 dans le cytosol et dans le noyau (Chaabane *et al.*, 2013 ; Pallepati et Averill-Bates, 2011c).





**Figure 1.11 Régulation de p53 en réponse au stress** (tiré de (Bode et Dong, 2004)). Différents signaux de stress peuvent mener à la phosphorylation ou à l'acétylation de p53 par des kinases et des acétyltransférases. Ces modifications vont mener à la stabilisation, à l'accumulation et à l'activation de p53 dans le noyau. p53 pourra alors activer la transcription de ses gènes cibles qui permettront la mise en place de différentes réponses cellulaires telles l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, la sénescence et l'inhibition de l'angiogenèse. Lorsque p53 n'est plus nécessaire, elle est ubiquitinée par MDM2 et dégradée par le protéasome. p53 peut également induire l'apoptose en se liant aux protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL à la membrane de la mitochondrie.

Au niveau du cytosol, p53 peut migrer à la mitochondrie et directement entraîner la MOMP via son interaction avec Bcl-2 et Bcl-xL (inhibition) ainsi que Bak (activation). p53 peut également déclencher l'apoptose en activant la protéine Bax (Chaabane *et al.*, 2013 ; Nikolettou *et al.*, 2013). Dans le noyau, p53 va pouvoir se lier à des séquences d'ADN spécifiques menant à la transactivation de nombreux gènes pro-apoptotiques tels les membres de la famille Bcl-2 Bid, Bax, Noxa et Puma, les caspases-6 et -10, Apaf1, Fas, DR5 et la protéine induite par p53 possédant un domaine de mort (PIDD) (Chaabane *et al.*, 2013 ; Jin et El-Deiry, 2005 ; Nikolettou *et al.*, 2013).

#### 1.4.2.6 Apoptose : rôle des ERO

Les ERO peuvent mener à l'apoptose des cellules, que ce soit indirectement, via des dommages à l'ADN, aux lipides et aux protéines, ou directement, via l'activation de divers signaux pro-apoptotiques, notamment par le biais de l'activation de MAP kinases telles JNK, les kinases régulées par des signaux extracellulaires (ERK) et p38. Une très forte concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pourra même inhiber les caspases, initiant de ce fait la mort par nécrose plutôt que par apoptose. Les ERO peuvent réguler l'expression des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et p53 grâce à la modification de résidus cystéine sensibles à l'oxydation sur leur domaine de liaison à l'ADN afin de moduler l'entrée en apoptose de la cellule (Gorrini *et al.*, 2013).

Le cas de la voie des récepteurs de mort est complexe : le superoxyde pourrait être un inhibiteur naturel de la mort cellulaire via Fas (Bedard et Krause, 2007) tandis que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causerait une surexpression de Fas et FasL et l'activation de la caspase-8 (Pallepati et Averill-Bates, 2011c).

Il est à noter que la MOMP peut aussi être activée par les ERO, qui sont produits principalement dans la mitochondrie au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire. Une surproduction de ERO peut mener au dysfonctionnement de la mitochondrie, à l'oxydation de sa structure et à l'ouverture des pores de

perméabilité transitoire de la mitochondrie (MTP), des canaux et des échangeurs, menant donc à la MOMP (Belizario *et al.*, 2015).

### 1.4.3 Autres voies de mort cellulaire

#### 1.4.3.1 Autophagie

L'autophagie est principalement une voie de maintien de l'homéostasie cellulaire. En conditions normales, elle permet le renouvellement des organelles et des protéines, la restructuration de la cellule pendant le développement et la différenciation et la production d'acides aminés en conditions de manque de nutriments (Jin et El-Deiry, 2005). Les constituants cellulaires devant être éliminés sont séquestrés dans des vésicules à bicouche lipidique appelées autophagosomes qui vont fusionner avec les lysosomes afin de détruire leur contenu grâce à des hydrolases acides (Fig. 1.6) (Chaabane *et al.*, 2013 ; Negroni *et al.*, 2015 ; Nikolettou *et al.*, 2013). En cas de stress, par exemple un manque de nutriment, le stress oxydatif ou encore l'accumulation de protéines mal repliées, l'autophagie va participer au sauvetage de la cellule en éliminant les organelles ou métabolites endommagés. En revanche, une utilisation excessive ou incontrôlée de l'autophagie pourra mener à la mort de la cellule par auto-digestion (Negroni *et al.*, 2015 ; Nikolettou *et al.*, 2013). Morphologiquement, cette mort se définit par la présence de très nombreuses vacuoles acides dans le cytoplasme et se différencie de l'apoptose par une absence de condensation de la chromatine (Chaabane *et al.*, 2013).

#### 1.4.3.2 Nécroptose

La nécroptose est une voie de mort cellulaire programmée indépendante des caspases. Comme son nom l'indique, elle apparaît comme un croisement de la nécrose, dont elle partage les caractéristiques morphologiques (dégradation de la membrane plasmique, libération du contenu de la cellule qui entraîne une réponse inflammatoire), et de l'apoptose, de par sa régulation cellulaire complexe. Par exemple, la nécroptose peut elle aussi être activée par la liaison de FasL sur son

récepteur, en association avec la kinase RIP3 plutôt qu'avec la procaspase 8, qui est inhibée. Les caspases, généralement associées à l'apoptose, sont des inhibiteurs de la nécroptose (Negroni *et al.*, 2015). On peut alors envisager que si l'activation des caspases, et donc de l'apoptose, échoue, la cellule entrera alors en nécroptose (Chaabane *et al.*, 2013 ; Negroni *et al.*, 2015).

#### 1.4.3.3 Pyroptose

La pyroptose permet aux cellules ayant été infectées par un pathogène de s'autodétruire. Pour cela, des récepteurs à l'intérieur des cellules vont reconnaître des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP), entraînant ainsi la formation d'un complexe multiprotéique appelé pyroptososome ou inflammasome. Ce complexe va entraîner l'activation de la caspase-1, une caspase n'ayant aucun lien avec l'apoptose, qui sera alors responsable de dommages à l'ADN ainsi que de la formation de pores au niveau de la membrane plasmique. Ces pores vont perturber l'équilibre osmotique de la cellule, conduisant à son gonflement puis à sa lyse, libérant ainsi de nombreux facteurs pro-inflammatoires, telles les cytokines, dans le milieu (Fig. 1.6). Cela aura pour effet d'attirer des cellules immunitaires qui pourront ainsi gérer l'infection par le pathogène (Bergsbaken *et al.*, 2009 ; Negroni *et al.*, 2015).

#### 1.4.3.4 Catastrophe mitotique

La catastrophe mitotique est un mécanisme de protection des cellules contre l'aneuploïdie, c'est-à-dire la présence d'un nombre anormal de chromosomes, condition pouvant mener à la transformation cancéreuse d'une cellule. Comme son nom l'indique, la catastrophe mitotique constitue un mécanisme de mort cellulaire en cas de problème majeur lors de la mitose. La mitose est la série d'événements qui permet la division d'une cellule. Son bon déroulement est assuré par des points de contrôle, comme il en existe tout au long du cycle cellulaire dont elle fait partie. Si un problème est détecté au niveau de l'un ou plusieurs de ces points de contrôle, comme par exemple au niveau de la réplication de l'ADN ou au niveau de l'attachement des



chromosomes au fuseau mitotique, le cycle cellulaire devrait être stoppé en attendant les réparations, ou la mort par apoptose si les dommages sont trop importants. Si le cycle cellulaire n'est pas arrêté, ou s'il reprend sans que les problèmes aient été réparés, une ségrégation aberrante des chromosomes peut avoir lieu. La cellule va se diviser de façon asymétrique, générant ainsi des cellules multinucléées aneuploïdes (Castedo *et al.*, 2004 ; Jin et El-Deiry, 2005 ; Mc Gee, 2015).

## 1.5 Traitements du cancer

Lorsque les cellules subissent des dommages à l'ADN, notamment dus aux ERO, mais qu'elles ne déclenchent pas l'un des différents types de mort cellulaire que nous venons de voir, elles peuvent entrer dans une phase de prolifération incontrôlée qui mènera à l'apparition d'une tumeur. Pour lutter contre ces tumeurs il existe différents traitements.

### 1.5.1 Traitements classiques

Les trois traitements auxquels les médecins ont le plus recours sont la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Ces traitements ne sont pas mutuellement exclusifs et sont souvent associés afin d'obtenir les meilleurs résultats possibles, le but étant d'éliminer l'intégralité de la tumeur lorsque cela est possible.

#### 1.5.1.1 Chirurgie

La chirurgie a pendant longtemps été le seul traitement connu contre le cancer. Elle consiste au retrait de la tumeur du tissu/organe dans lequel elle se trouve. Afin d'assurer l'élimination de l'intégralité de la masse tumorale, certains tissus sains environnants peuvent également être retirés au cours de l'opération de façon à limiter les risques de rechute. Ainsi, dans le cas du cancer du sein, une ablation totale du sein peut être recommandée. De nouveaux outils chirurgicaux sont mis à la disposition des



médecins, comme par exemple la cryoablation. Cette technique utilise de l'azote liquide ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) appliqué à l'aide d'une sonde placée en contact avec la tumeur. Le froid extrême dénature les protéines et déshydrate les cellules tumorales, causant leur mort (Wu *et al.*, 2015). De la même façon, l'ablation par radiofréquence utilise une sonde insérée dans la tumeur et émettant un courant de radiofréquence. Ce courant cause un échauffement important des cellules cancéreuses ( $70^{\circ}\text{C}$ ), menant à leur mort (Wu *et al.*, 2015).

La chirurgie est très souvent associée à la chimiothérapie ou à la radiothérapie, que ce soit pour diminuer la taille de la tumeur avant la chirurgie ou pour s'assurer d'éliminer tous les tissus cancéreux après la chirurgie (Institut National du Cancer, 2014).

#### 1.5.1.2 Chimiothérapie

La chimiothérapie est l'utilisation de composés chimiques pour tuer les cellules cancéreuses. Ces composés ciblent des facteurs impliqués dans le cycle cellulaire des cellules cancéreuses de façon à empêcher leur prolifération et induire leur mort. Ces composés sont souvent utilisés en combinaison de façon à viser différents points de contrôle du cycle cellulaire simultanément. L'utilisation de plusieurs composés permet également d'utiliser des doses plus faibles afin de diminuer les effets secondaires et de retarder autant que possible l'apparition de résistance à ces composés (Société Canadienne du Cancer, 2015). La chimiothérapie peut être administrée par voie orale ou par voie intraveineuse, selon la molécule et le dosage.

Les agents chimiothérapeutiques se classent en trois groupes principaux : les agents alkylants, tels le melphalan et l'ifosfamide, les antimétabolites, telle la leustatin, et les agents d'origine naturelle telle la doxorubicine. Leur activité cytotoxique passe par des modifications de l'ADN ou des enzymes nécessaires à sa réplication. Ce mode d'action est très dommageable chez les cellules cancéreuses,

puisque leurs systèmes de réparation de l'ADN sont peu efficaces et que leur prolifération rapide ne leur permet pas de disposer de beaucoup de temps pour réparer l'ADN entre deux réplifications.

Malheureusement, les agents chimiothérapeutiques ne sont pas spécifiques des cellules cancéreuses et les cellules normales risquent d'être affectées. Cependant, dans une cellule normale, les modifications à l'ADN causées par ces agents cytotoxiques devraient être rapidement repérées et réparées. En revanche, ces effets nocifs peuvent affecter des cellules saines en division telles les cellules du sang, des intestins et des follicules pileux, menant à des effets secondaires tels les vomissements et la perte des cheveux. D'autres effets secondaires plus toxiques peuvent être observés, comme par exemple la cardiotoxicité de la doxorubicine, qui imposent le respect de doses maximales d'agents chimiothérapeutiques au-delà desquelles les effets délétères pour le patient sont trop importants (Société Canadienne du Cancer, 2015).

#### 1.5.1.3 Radiothérapie

Le principe de la radiothérapie est de bombarder la tumeur de rayons ionisants de façon à endommager l'ADN de ces cellules et provoquer leur mort. Sur le même principe que la chimiothérapie, les cellules à haut taux de division seront davantage affectées puisque les autres auront l'occasion de réparer les dégâts causés à l'ADN. L'avantage de la radiothérapie est sa capacité à être plus concentrée sur la tumeur que sur les tissus environnants, en orientant les rayons ionisants de façon à cibler le centre de la tumeur. Les effets de la radiothérapie sont exacerbés chez les tumeurs bien oxygénées puisque les rayons vont modifier les molécules d'O<sub>2</sub> de façon à former des ERO, qui à leur tour vont causer des dommages à l'ADN. Le centre de la tumeur, qui a un accès limité aux vaisseaux sanguins et qui est donc en hypoxie, est en premier lieu généralement moins sensible à la radiothérapie, mais l'élimination progressive des couches extérieures de la tumeur lui donne accès au sang et sa réserve d'oxygène et permet donc l'élimination totale de la tumeur. Malheureusement, certaines cellules

développent une résistance à la radiothérapie qui entraîne donc la nécessité de combiner la radiothérapie à d'autres traitements pour pouvoir éradiquer ces tumeurs résistantes (Société Canadienne du Cancer, 2015).

### 1.5.2 Autres traitements

Les progrès de la recherche fondamentale ont récemment permis l'addition de nombreuses autres techniques anti-cancer, qui peuvent être utilisées seules ou en combinaison avec les trois techniques principales que nous venons d'énumérer. Nous aborderons ici certaines de ces nouvelles thérapies.

#### 1.5.2.1 Immunothérapie

L'immunothérapie est l'une des thérapies anti-cancer les plus prometteuses. Son principe est d'utiliser le système immunitaire pour lutter contre les tumeurs. L'un des aspects de cette thérapie est l'utilisation d'anticorps monoclonaux. Ces anticorps, produits en laboratoire, ciblent des protéines présentes à la surface des cellules tumorales. Ces protéines peuvent être spécifiques à la tumeur ou surexprimées par celle-ci. Une fois que l'anticorps a reconnu son antigène, diverses cellules immunitaires pourront l'identifier et détruire la cellule cancéreuse. À ce jour, six anticorps monoclonaux sont en utilisation en tant que thérapie anti-cancer, pour le traitement de lymphomes non-Hodgkiniens, de leucémies lymphoïdes chroniques et de cancers du sein et du colon. Cette stratégie a l'avantage d'être très spécifique aux cellules tumorales et donc présente très peu de toxicité pour les cellules saines environnantes et peu d'effets secondaires (Neves et Kwok, 2015).

D'autres types d'immunothérapie sont en développement, comme le transfert adoptif de lymphocytes T, qui consiste à prélever des lymphocytes T au patient puis à les activer et les multiplier pour former une population de lymphocytes T anti-tumoraux qui sera réinjectée au patient. L'utilisation de vaccins contenant des cellules dendritiques est aussi en développement. Le but est de charger les cellules

dendritiques d'antigènes tumoraux de façon à ce qu'elles puissent à leur tour activer les lymphocytes  $CD4^+$  et  $CD8^+$  qui pourront alors éliminer les cellules cancéreuses de façon ciblée. L'immunothérapie anti-cancer est très prometteuse mais de nombreux progrès restent encore à faire, notamment dans le choix des antigènes tumoraux utilisés afin d'obtenir la réponse la plus efficace et spécifique possible (Neves et Kwok, 2015).

#### 1.5.2.2 Thérapie photodynamique

La thérapie photodynamique consiste en l'administration d'un agent photosensibilisant au patient. Cet agent va pénétrer dans toutes les cellules, cancéreuses ou non, mais semble s'accumuler de façon plus importante chez les cellules cancéreuses, pour des raisons encore mal comprises (Henderson et Dougherty, 1992). Lorsque stimulé par la lumière émise par un laser de faible intensité, cet agent photosensibilisant va réagir avec l'oxygène pour créer des ERO qui vont endommager la cellule et mener à sa mort (Henderson et Dougherty, 1992 ; Lucena *et al.*, 2015). L'activité anti-tumorale des agents photosensibilisants repose donc sur une cytotoxicité directe mais aussi sur l'endommagement du réseau vasculaire tumoral et sur l'activation de la réponse immunitaire à l'encontre de la tumeur (Lucena *et al.*, 2015 ; Mfouo-Tynga et Abrahamse, 2015). Cette thérapie présente comme avantages une toxicité réduite pour les cellules saines puisque le rayonnement lumineux d'excitation est localisé spécifiquement sur la tumeur, et peu d'effets secondaires, principalement une légère douleur ressentie lors de l'application du laser (Mfouo-Tynga et Abrahamse, 2015). Cette technique ne peut être utilisée que sur des tumeurs de surface, les rayons lumineux utilisés pénétrant peu dans les tissus. Cette thérapie peut être combinée avec les trois thérapies «traditionnelles» pour de meilleurs résultats. Par exemple, la radiothérapie faisant elle aussi appel à la production d'ERO pour détruire les cellules cancéreuses, elle est régulièrement associée à la thérapie photodynamique pour un effet synergique (Lucena *et al.*, 2015).

### 1.5.2.3 Nanoparticules

L'utilisation de nanoparticules pour la livraison d'agents chimiothérapeutiques ou de complexes d'ADN pour thérapie génique est présentement à l'étude. La principale difficulté est l'acheminement de ces nanoparticules jusqu'à la tumeur, puisqu'elles ont tendance à s'accumuler dans le foie. L'une des solutions est de les recouvrir de ligands qui ont montré une grande affinité pour les cellules tumorales, tels la transferrine ou le facteur de croissance épidermique (Brannon-Peppas et Blanchette, 2004). Des nanoparticules pouvant être inhalées sont en développement, dans le cadre du traitement du cancer des poumons, pour délivrer les agents thérapeutiques directement aux tumeurs présentes dans les alvéoles pulmonaires. De nombreuses recherches sont toutefois nécessaires avant d'envisager une utilisation à grande échelle de ces particules. En effet, selon leur structure elles peuvent être biodégradables ou non, et leur présence, ou celle du produit de leur dégradation, peut provoquer une inflammation qui peut être dommageable pour les tissus environnants (Ahmad *et al.*, 2015).

### 1.5.2.4 Traitements personnalisés

L'avenir des traitements anti-cancer passera par la mise en place de traitements personnalisés, adaptés au génome et à l'environnement du patient. L'étude épigénétique, protéomique et métabolomique de chaque patient permettra ainsi la mise en place de traitements «sur mesure», permettant d'espérer de meilleurs taux de rémission, et par la même occasion l'allègement de la facture médicale pour les patients comme pour les systèmes de santé (Wong et Deng, 2015).

### 1.5.3 Hyperthermie

L'hyperthermie est une technique non-invasive dont le but est de chauffer (39°C-45°C) la tumeur afin de provoquer la mort des cellules cancéreuses, tout en ayant un impact minimal sur les tissus sains environnants (van der Zee, 2002). Bien que les premières recherches sur les effets de l'hyperthermie datent du 19<sup>ième</sup> siècle, ce



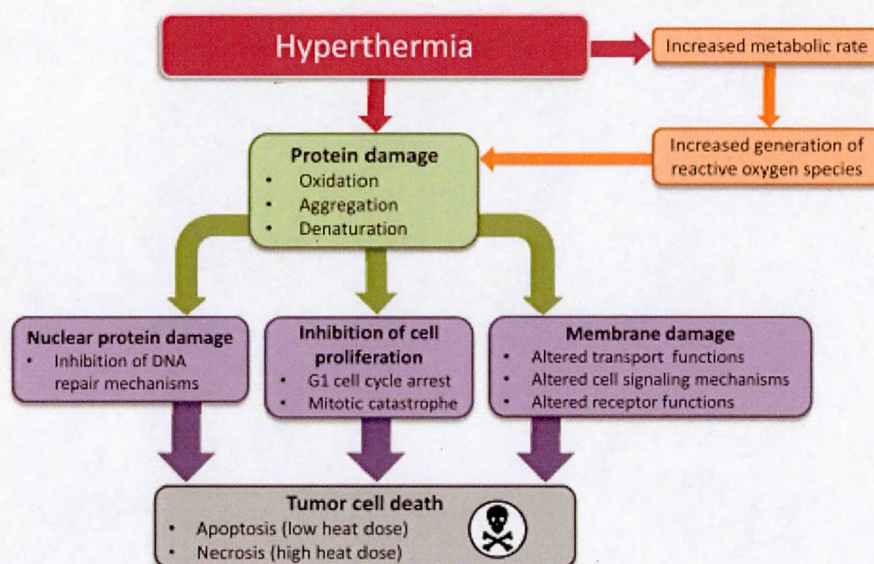
n'est qu'à partir des années 1970 que l'hyperthermie a fait l'objet d'études plus poussées (Gerner *et al.*, 1976 ; Henle *et al.*, 1978 ; Petrovich *et al.*, 1989). Depuis lors, la cytotoxicité de l'hyperthermie, seule ou en combinaison avec d'autres traitements, a été établie. L'utilisation de l'hyperthermie présente peu d'effets secondaires, en comparaison des traitements dits classiques : principalement des brûlures légères, des fièvres et des vomissements. De plus, l'utilisation de l'hyperthermie en combinaison avec la radio- et chimiothérapie permettant d'en réduire les doses, l'hyperthermie diminue les effets secondaires liés à ces traitements (Baronzio *et al.*, 2009 ; Bettaieb *et al.*, 2013).

#### 1.5.3.1 Mode d'action

##### 1.5.3.1.a Hyperthermie seule

L'effet cytotoxique de l'hyperthermie passe par de nombreux changements au sein des cellules, menant éventuellement à la perte de l'homéostasie et à la mort des cellules (Hildebrandt *et al.*, 2002 ; Lindquist, 1986 ; Roti Roti, 2008). Les principaux changements opérés par l'hyperthermie semblent être la dénaturation et l'aggrégation de protéines ainsi que l'inactivation de la synthèse et de la réparation de l'ADN (Fig. 1.12) (Richter *et al.*, 2010 ; Sonna *et al.*, 2002). Ces changements sont accompagnés par une augmentation du métabolisme menant à une accumulation d'ERO qui causeront des dommages aux protéines et aux lipides. Tous ces phénomènes mèneront éventuellement à la perte de l'homéostasie cellulaire et à la mort de la cellule, par apoptose ou par nécrose (Fig. 1.12). En effet, il a été prouvé que l'hyperthermie active les trois voies principales de l'apoptose : la voie des récepteurs de mort (Bettaieb et Averill-Bates, 2008), la voie du RE (Bettaieb et Averill-Bates, 2015) et la voie mitochondriale (Bettaieb et Averill-Bates, 2005). L'efficacité de l'hyperthermie pourrait aussi passer par le fait que les cellules cancéreuses semblent être plus sensibles aux changements de température que les cellules saines, en partie à cause de différences dans l'expression de protéines de choc

thermique (Hsp) (Sugahara *et al.*, 2008), mais aussi à cause d'une vascularisation moins importante (surtout au centre de la tumeur), ne permettant pas l'élimination de l'excès de chaleur via la circulation sanguine (Fokas *et al.*, 2012). De plus, l'hyperthermie étant capable de provoquer une catastrophe mitotique, les cellules en division et donc les cellules cancéreuses y sont plus sensibles (Yuguchi *et al.*, 2002).



**Figure 1.12 Les modifications produites au niveau cellulaire par l'hyperthermie** (tiré de (Bettaieb *et al.*, 2013)). À travers la détérioration des protéines, de façon directe ou dû à la production d'ERO, l'hyperthermie provoque des dommages aux membranes et à l'ADN ainsi que l'inhibition de la prolifération cellulaire, menant ainsi à la mort de la cellule par apoptose ou par nécrose.

De plus, l'hyperthermie peut causer des changements au niveau de l'environnement de la tumeur. Par exemple, les tumeurs étant incapables d'adapter leur circulation sanguine aux effets de la chaleur, l'hyperthermie ( $>42^{\circ}\text{C}$ ) va

provoquer un effondrement du réseau vasculaire tumoral. Cela aura pour effet de diminuer les réserves en oxygène, d'abaisser le pH et de couper l'approvisionnement en nutriments, et donc de rendre ces cellules encore plus sensibles aux chocs thermiques. Ces différents changements pouvant modifier la réponse des tumeurs à d'autres traitements, l'hyperthermie est utilisée en combinaison avec ceux-ci.

#### 1.5.3.1.b Hyperthermie en combinaison avec d'autres thérapies

Parmi les modifications des cellules et de leur environnement causées par l'hyperthermie, certaines permettent d'augmenter la livraison des agents chimiothérapeutiques aux tumeurs. Par exemple, les dommages créés aux lipides vont perturber l'intégrité et la perméabilité membranaire, permettant donc le passage de molécules de chimiothérapie (Bates et Mackillop, 1986). De plus, l'augmentation du flux sanguin dans la tumeur par une hyperthermie forte ( $>42^{\circ}\text{C}$ ) va permettre d'augmenter le taux d'agents chimiothérapeutiques pouvant entrer en contact avec une cellule tumorale donnée. En cas d'hyperthermie modérée ( $<42^{\circ}\text{C}$ ), l'absence d'oxygène et le pH faible présents au centre de la tumeur en feront une cible de choix de l'hyperthermie alors qu'il s'agit justement de la partie de la tumeur qui sera le plus difficile à atteindre par les agents chimiothérapeutiques. L'hyperthermie et la chimiothérapie travaillent alors de concert pour éliminer différentes parties de la tumeur (Song *et al.*, 2005). L'hyperthermie est également utilisée dans le traitement de cellules multi-résistantes à la chimiothérapie, puisqu'elle permet d'augmenter la cytotoxicité des agents chimiothérapeutiques chez ces cellules et qu'elle est également capable de les éliminer à elle seule, de par l'activation de facteur pro-apoptotiques (Wrzal *et al.*, 2008).

En ce qui concerne la radiothérapie, l'hyperthermie est capable d'éliminer les cellules en cas d'hypoxie et de faible pH, conditions qui favorisent la résistance des cellules à la radiothérapie (Sugahara *et al.*, 2008). L'hyperthermie est donc considérée comme un radio-sensibilisateur puissant. L'augmentation du flux sanguin et donc du

taux d'oxygène dans les tumeurs permet également d'augmenter l'efficacité de la radiothérapie, qui repose sur la formation d'ERO pour détruire les cellules cancéreuses (Sakaguchi *et al.*, 1995).

L'hyperthermie peut également être utilisée en combinaison avec l'immunothérapie. En effet, en cas d'hyperthermie les cellules augmentent leur production d'Hsp, mais il semblerait que seules les cellules cancéreuses vont les présenter à leur surface. Cette caractéristique fait donc des Hsp des cibles idéales pour les immunothérapies par anticorps monoclonaux ou par cellules dendritiques (Jolesch *et al.*, 2012).

L'utilisation de nanoparticules en combinaison avec l'hyperthermie est aussi à l'étude. Cette technique utilise des nanoparticules thermosensibles qui ne libèrent leur contenu qu'en présence d'une température suffisamment élevée. Ce contenu peut être un agent cytotoxique aussi bien que des brins d'ADN ou d'acide ribonucléique (ARN) pour thérapie génique (Affram *et al.*, 2015).

#### 1.5.3.2 Les différents types d'hyperthermie

En fonction de la localisation de la tumeur, différents types d'hyperthermie peuvent être appliqués. Le but est toujours d'avoir une couverture maximale de la tumeur tout en évitant les dommages potentiels aux tissus sains.

L'hyperthermie locale (41-45°C) est focalisée sur la tumeur et utilise des sources de chaleurs variées, telles les microondes, les ondes radios et les ultrasons. Selon la position de la tumeur dans le corps, la source de chaleur peut être externe (avec utilisation d'ondes à haute fréquences), intra-luminaire ou interstitielle (avec utilisation de sondes). Ce traitement est plus approprié pour les tumeurs solides et de préférence peu profondes car les ondes utilisés pénètrent peu dans les tissus. Lors d'une application externe, un bolus d'eau est souvent positionné entre l'appareil et la



peau du patient afin d'éviter les brûlures superficielles (Baronzio *et al.*, 2009 ; Bettaieb *et al.*, 2013 ; Wust *et al.*, 2002).

L'hyperthermie régionale (41-45°C) est appliquée à l'intégralité d'un organe/tissu. Les sources de chaleur sont alors disposées tout autour de l'organe à traiter. Une autre possibilité est la perfusion : du sang est extrait du patient et chauffé avant d'être réinjecté dans le membre d'intérêt, en présence ou non d'un agent cytotoxique. Enfin, il est possible de baigner la cavité péritonéale dans un liquide chauffé contenant des agents chimiothérapeutiques (Baronzio *et al.*, 2009 ; Bettaieb *et al.*, 2013 ; Wust *et al.*, 2002).

L'hyperthermie globale (<42°C) est quant à elle utilisée pour traiter les cancers ayant métastasé, des tumeurs étant donc présentes dans plusieurs organes. La chaleur peut alors être dispensée par des bains d'eau chaude, des rayons infrarouges ou des matelas chauffants. Cette technique nécessite souvent la sédation du patient. De plus, les effets nocifs sur les tissus sains sont plus nombreux que pour les autres types d'hyperthermie à cause du manque de spécificité de l'hyperthermie globale (Baronzio *et al.*, 2009 ; Bettaieb *et al.*, 2013 ; Wust *et al.*, 2002).

De par sa plus grande spécificité, la technique la plus prometteuse est celle de l'hyperthermie locale. Toutefois, son utilisation est limitée par la qualité des techniques d'imagerie disponibles ainsi que par la précision des sources de chaleur. De nombreuses études se penchent sur ces questions et le développement de l'imagerie thermique par résonnance magnétique laisse présager une plus grande utilisation de l'hyperthermie dans le futur (Chae *et al.*, 2014).

L'une des toutes dernières avancées dans le domaine concerne l'hyperthermie intracellulaire. Des nanoparticules magnétiques sont injectées dans la tumeur et vont être capable de générer de la chaleur suite à l'application d'un champ magnétique alternatif. En plus de produire la chaleur directement dans la tumeur, ces particules



sont capables de délivrer des agents chimiothérapeutiques pour amplifier la mort cellulaire produite par hyperthermie. Ce traitement est très prometteur puisqu'il permet une excellente focalisation des traitements et donc présente très peu d'effets secondaires (Blanco-Andujar *et al.*, 2016 ; Kossatz *et al.*, 2015).

#### 1.5.3.3 Sources de chaleur

Nous décrivons ici les deux sources de chaleur les plus utilisées dans le cadre de l'hyperthermie locale et régionale.

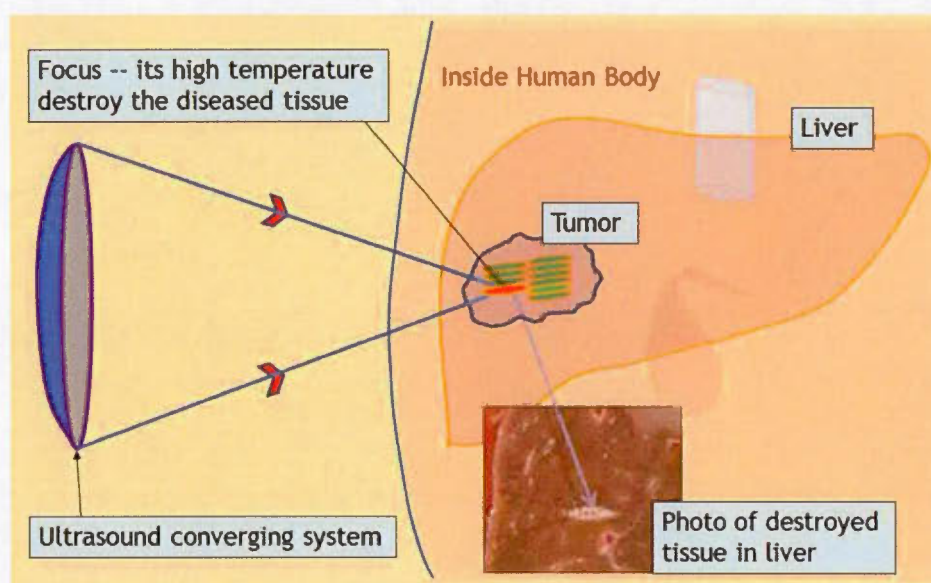
##### 1.5.3.3.a Radiofréquences

Dans le paragraphe 1.5.1.1. Chirurgie, nous avons vu que les radiofréquences peuvent être utilisées pour appliquer une température très élevée (70°C) sur la tumeur et ainsi provoquer sa mort. Les radiofréquences peuvent également être utilisées à de plus faibles intensités dans le cas d'une hyperthermie non-ablative. Dans ce cas, l'élévation de température reste modérée (43-44°C). Le but est de sensibiliser les tissus cancéreux de façon à augmenter l'efficacité et la spécificité d'une chimiothérapie concomitante (Zhou *et al.*, 2015). En effet, l'échauffement des cellules cancéreuses va mener à une augmentation de leur métabolisme et de la perméabilité de leurs membranes, ce qui implique donc une plus grande assimilation du composé chimiothérapeutique (Zhou *et al.*, 2015). La technologie Synergo® repose sur ce principe pour le traitement du cancer de la vessie n'infiltrant pas le muscle. Une sonde insérée dans la vessie permet l'application de radiofréquences qui vont augmenter la température de la paroi de la vessie jusqu'à 43°C pendant que l'agent thérapeutique est libéré (Synergo, 2015).

##### 1.5.3.3.b Ultrasons focalisés de haute intensité

Tout comme les radiofréquences, les ultrasons focalisés de haute intensité (HIFU) peuvent être utilisés afin d'effectuer l'ablation de la tumeur (Fig. 1.13). Les ultrasons vont non seulement provoquer la nécrose des cellules tumorales de par

l'élévation de la température ( $>65^{\circ}\text{C}$ ) mais également mener à la formation de bulles de gaz à l'intérieur des cellules. Sous l'action des ultrasons ces bulles vont osciller et finalement s'effondrer, créant un mouvement des fluides cellulaires menant à la perturbation de l'intégrité membranaire (Chae *et al.*, 2014 ; Malietzis *et al.*, 2013 ; Maloney et Hwang, 2015). Mais les ultrasons focalisés de haute intensité peuvent également être utilisés pour appliquer des températures plus modérées ( $42\text{-}43^{\circ}\text{C}$ ), afin non pas de provoquer la nécrose des cellules tumorales mais plutôt d'utiliser l'hyperthermie pour augmenter l'efficacité d'un traitement de chimiothérapie (Chae *et al.*, 2014).



**Figure 1.13 Représentation schématique d'un traitement par HIFU** (tiré du site internet de (Sumo, 2009)). Un émetteur permet de faire converger les ultrasons jusqu'à un point de focus au sein de la tumeur. Cette zone sera alors détruite par la forte chaleur émise par les rayons. Un système d'imagerie est souvent couplé à l'émetteur afin de pouvoir suivre la destruction des tissus cancéreux et changer le focus des rayons. Un bolus d'eau est souvent placé entre l'émetteur et la peau du patient afin de faciliter le déplacement des ondes. En dehors de la zone de focus les tissus sont parfaitement conservés.

La possibilité d'un suivi par imagerie simultanée (notamment par imagerie à résonnance magnétique) ainsi que la capacité des ultrasons à être focalisés de façon très précise sur la tumeur font des HIFU une technique très peu invasive et très peu toxique pour les tissus environnants.

Il est intéressant de noter que les ultrasons focalisés de haute intensité ont récemment été utilisés afin d'ouvrir la barrière hémato-encéphalique, notamment pour permettre le passage d'agents chimiothérapeutiques.

#### 1.5.3.4 Conclusion

L'hyperthermie est donc un traitement contre le cancer qui, même s'il est connu depuis plusieurs décennies, reste souvent confiné aux essais cliniques. Les techniques utilisées pour l'administration de l'hyperthermie ne cessent d'évoluer, devenant de plus en plus précises grâce notamment aux avancées dans le domaine de l'imagerie thermique. Cette précision accrue permet de diminuer les effets secondaires, déjà peu nombreux, de l'hyperthermie. Les modes d'administration potentiels de l'hyperthermie évoluent également, de nombreuses recherches portant sur l'utilisation de nanoparticules thermosensibles. Cette technologie permet d'affiner encore le champ d'action de l'hyperthermie de façon à pouvoir éliminer totalement les dommages potentiels aux tissus environnants.

### 1.6 Thermotolérance

#### 1.6.1 Introduction

La thermotolérance a été découverte en tant qu'effet secondaire de l'hyperthermie. En effet, suite à l'administration d'un traitement par hyperthermie, les cellules exposées à la chaleur (qu'elles soient cancéreuses ou non) développent une réponse adaptative qui leur permet de résister à des stress thermiques subséquents

(Henle *et al.*, 1978). On distingue deux types de thermotolérance : l'une est acquise à la suite d'une exposition à des températures élevées (42-45°C), pendant des temps courts (<1 h), et pourrait donc apparaître au niveau des cellules tumorales. L'autre est acquise à la suite d'une exposition à une température relativement douce (39-41°C) pendant des temps plus longs (>3 h), et correspond souvent à une élévation globale de la température, par exemple un état fébrile pouvant être un effet secondaire du traitement par hyperthermie (Gerner *et al.*, 1976 ; Henle *et al.*, 1978).

Dans la suite de ce mémoire nous nous focaliserons sur la thermotolérance modérée, acquise suite à une exposition longue à une température douce.

Cette résistance accrue aux effets des chocs thermiques pourrait représenter un problème pour l'utilisation clinique de l'hyperthermie, mais sa nature transitoire permet de régler facilement le problème en espaçant suffisamment les séances de thérapie.

### 1.6.2 Modes d'action

Afin de protéger les cellules contre l'apoptose induite par les chocs thermiques (Bettaieb et Averill-Bates, 2005, 2008, 2015) et le stress oxydatif (Pallepati et Averill-Bates, 2010, 2011a, 2011b), la thermotolérance active toute une série de défenses.

#### 1.6.2.1 Protéines de choc thermique

Les Hsp ont été les premières à être étudiées dans le cadre de la thermotolérance (Bettaieb et Averill-Bates, 2005, 2008 ; Shellman *et al.*, 2008 ; Singh et Hasday, 2013 ; Subjeck *et al.*, 1982). En effet, il a été montré que l'acquisition de la thermotolérance dépend de la présence du facteur de transcription «heat-shock factor 1» (Hsf1), les cellules Hsf1 (-/-) étant incapable de développer la thermotolérance (McMillan *et al.*, 1998). Suite à leur activation, les Hsp vont se séparer de Hsf1 qui pourra alors transloquer au noyau afin d'initier la transcription de



nombreux gènes, notamment ceux codant pour des Hsp (Niforou *et al.*, 2014). Ainsi, les Hsp27, Hsp32, Hsp60, Hsp70, Hsp90 et Hsp110 sont surexprimées chez les cellules rendues thermotolérantes après 3 h d'exposition à 40°C (Bettaieb et Averill-Bates, 2005, 2008). Le rôle premier des Hsp est celui de chaperonne : elles vont donc aider au repliement de divers polypeptides, permettre le repliement de protéines endommagées ou mal repliées, réguler la dégradation des protéines ou encore faciliter leur translocation à différents compartiments cellulaires (Arya *et al.*, 2007). Comme l'hyperthermie provoque une dénaturation des protéines, la présence accrue d'Hsp permet de limiter le nombre de protéines dénaturées et donc leur agrégation, empêchant ainsi les cellules d'entrer en phase de stress du RE.

Certaines Hsp (Hsp-27, 70, 90) possèdent également un rôle anti-apoptotique. Ainsi, Hsp90 peut inhiber l'apoptose au niveau des récepteurs de mort et au niveau de la formation de l'apoptosome et active des signaux de survie via les voies de signalisation de la protéine kinase B (PKB ou AKT) et NF-κB. De plus, Hsp70 intervient à de nombreux endroits dans la voie des récepteurs de mort et la voie mitochondriale, notamment pour inhiber la formation de l'apoptosome, l'activation de la caspase-8 et la troncation de Bid en tBid. Hsp27 peut également inhiber l'apoptose à différents niveaux dans ces deux voies et promouvoir la survie de la cellule via NF-κB. Le cas de Hsp60 est un peu plus complexe : cette protéine de choc thermique peut à la fois inhiber l'apoptose en séquestrant Bax et activer l'apoptose en participant à la maturation de la procaspase-3 (Arya *et al.*, 2007). De plus, les Hsp peuvent être activées par d'autres types de stress que l'hyperthermie, notamment par le stress oxydatif (Niforou *et al.*, 2014).

#### 1.6.2.2 Évènements anti-apoptotiques

La thermotolérance est capable de protéger les cellules contre l'activation de nombreuses protéines et cascades d'évènements apoptotiques à la suite d'un stress (choc thermique ou stress oxydatif par exemple). En ce qui concerne la voie



apoptotique des récepteurs de mort, la thermotolérance (40°C - 3 h) permet d'inhiber l'augmentation due au stress de l'expression du ligand FasL, de la molécule adaptatrice FADD et des caspases-2, 8 et 10, et donc de diminuer l'activation de cette voie (Bettaieb et Averill-Bates, 2008 ; Pallepati et Averill-Bates, 2011b). La voie mitochondriale de l'apoptose peut également être perturbée par la thermotolérance à plusieurs niveaux : le clivage de Bid en tBid et la sortie dans le cytosol du cyt c sont réprimés ainsi que l'activité de la caspase-9 (Bettaieb et Averill-Bates, 2008 ; Pallepati et Averill-Bates, 2010, 2011b). De plus, l'activation par un stress de la caspase-3, caspase terminale commune aux trois voies principales de l'apoptose, est fortement diminuée chez les cellules thermotolérantes (40°C - 3 h). De même, le clivage des protéines PARP et ICAD, qui sont des substrats de la caspase-3 dont le clivage mène à la fragmentation de l'ADN, est réduit chez ces cellules thermotolérantes, de même que la translocation au noyau de AIF, lui aussi responsable de la condensation et de la fragmentation de l'ADN (Bettaieb et Averill-Bates, 2008 ; Pallepati et Averill-Bates, 2010, 2011b).

#### 1.6.2.3 Antioxydants

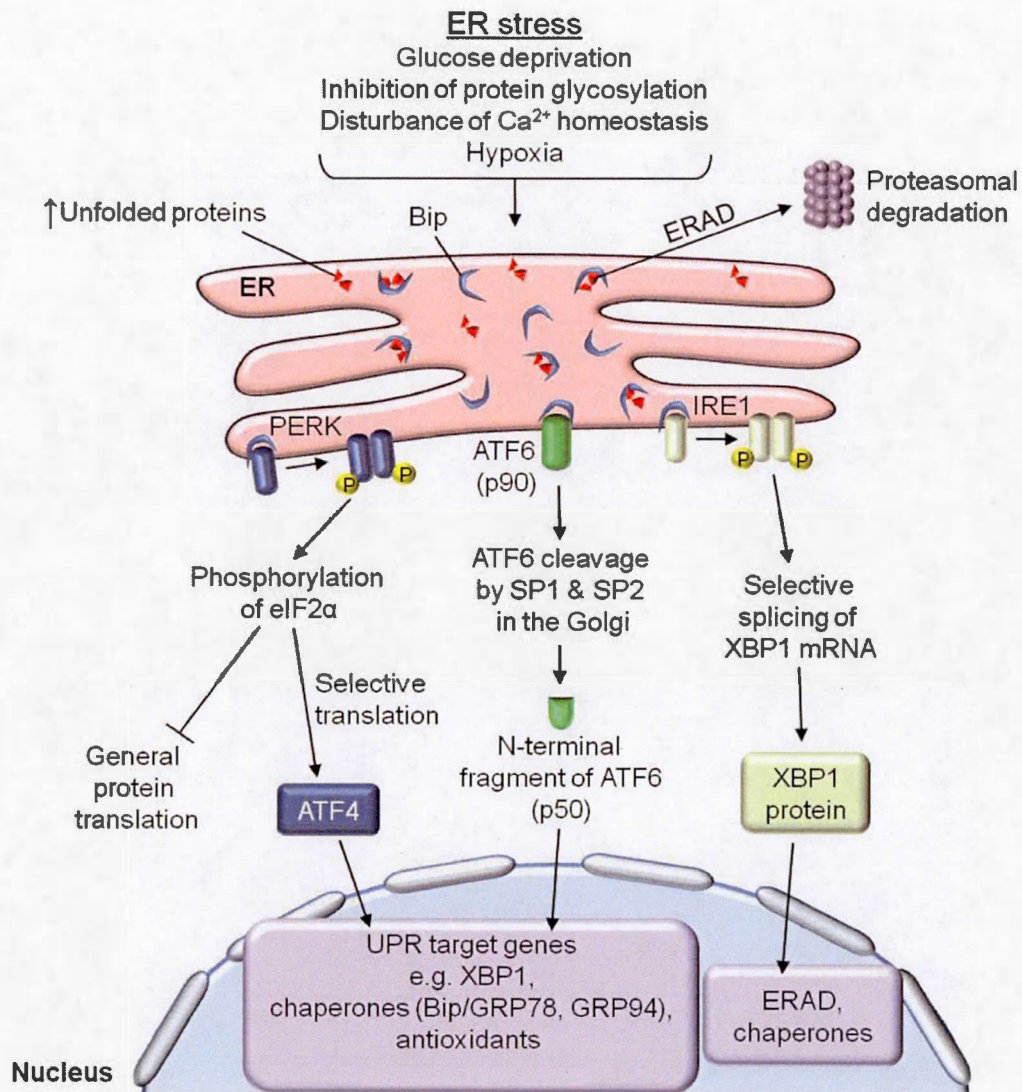
Le conditionnement des cellules à 40°C pendant 3h provoque une augmentation de l'expression et l'activité de plusieurs antioxydants. En effet, les enzymes MnSOD, qui catalyse la transformation du superoxyde en peroxyde d'hydrogène, catalase, qui permet la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau, GCL, qui permet la formation du GSH, ainsi que la molécule de GSH elle-même, qui transforme également le peroxyde d'hydrogène en eau, sont régulées à la hausse par la thermotolérance (Pallepati et Averill-Bates, 2010).

#### 1.6.2.4 Stress du réticulum endoplasmique

La thermotolérance (40°C - 3 h) permet également de moduler l'expression de nombreux facteurs activés par le stress du RE. Le stress du RE est enclenché en réponse à l'accumulation de protéines mal repliées et pourra mener soit à la survie de

la cellule via l'UPR soit à la mort de la cellule par apoptose. Le stress du RE implique trois voies : l'inhibition de la traduction pour limiter le nombre de nouvelles protéines, l'activation de gènes codant pour les protéines du stress du RE et la dégradation des protéines associées au RE (ERAD) qui consiste en la translocation des protéines mal repliées ou agrégées au cytoplasme afin d'être ubiquitinées et dégradées par le protéasome (Fig. 1.14). Trois protéines senseurs sont liées à ces différentes voies : IRE1, ATF6 et PERK. En conditions normales, ces facteurs sont séquestrés dans la lumière du RE par la chaperonne Bip. En conditions de stress, Bip va libérer ces protéines qui vont pouvoir activer leurs voies respectives tandis que Bip va exercer son activité de chaperonne en se liant aux protéines mal repliées (Schroder et Kaufman, 2005). PERK et IRE1 vont s'activer par homo-oligomérisation et autophosphorylation. Une fois activé, PERK pourra phosphoryler le facteur eucaryotique d'initiation  $2\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) qui permet d'inhiber la traduction de nouvelles protéines afin d'éviter leur accumulation dans le RE. eIF2 $\alpha$ , IRE1 et ATF6 sont tous les trois capables d'activer la transcription de chaperonnes telles que Bip : eIF2 $\alpha$  grâce à la traduction sélective d'ATF4, IRE1 via l'expression du facteur de transcription XBP1 et ATF6 directement en migrant au noyau après clivage de sa partie C-terminale (Calton *et al.*, 2002).

Le stress du RE peut également mener à la mort de la cellule par apoptose via les mêmes voies qui auront dans ce cas pour but d'activer le facteur de transcription CHOP ainsi que les caspases-4 et -7.

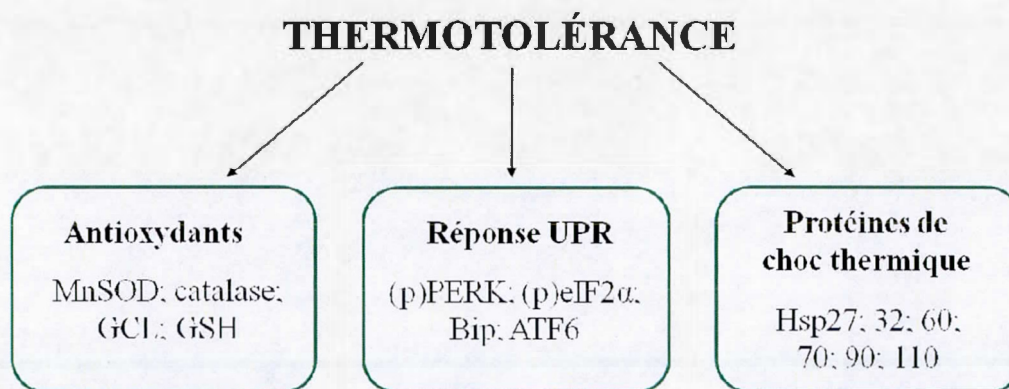


**Figure 1.14 La voie de survie du stress du RE ou réponse UPR** (adapté de (Pallepati et Averill-Bates, 2011c)). Suite à divers stress, des protéines mal repliées peuvent s'accumuler dans le RE, menant à l'activation de trois voies : la voie PERK/eIF2α/ATF4, la voie ATF6 et la voie IRE1/XBP1 qui mènent toutes à la transcription de chaperonnes pour tenter de remédier à la situation.

La thermotolérance permet la surexpression de PERK et eIF2 $\alpha$  ainsi que de leur forme phosphorylée (Pallepati et Averill-Bates, 2011a). De plus, le nombre de transcrits codants pour les protéines PERK, Bip et ATF6 est augmenté par la thermotolérance (Bettaieb et Averill-Bates, 2015). Il semblerait donc que le conditionnement des cellules à 40°C, qui représente un stress modéré, permette d'augmenter l'activité de protéines liées à l'UPR et donc de contribuer à la survie de la cellule. En revanche, la thermotolérance protège les cellules contre l'activation des protéines PERK, eIF2 $\alpha$ , IRE1, XBP1 et ATF6 par les chocs thermiques (42-43°C) (Bettaieb et Averill-Bates, 2015), puisque dans ce cas de stress intense ces voies de stress du RE peuvent mener à l'apoptose. Cela est confirmé par le fait que la thermotolérance protège les cellules contre l'activation de CHOP et des caspases-4 et -7 par les chocs thermiques (42-43°C) (Bettaieb et Averill-Bates, 2015) ou le peroxyde d'hydrogène (Pallepati et Averill-Bates, 2011a).

### 1.6.3 Conclusion

Le conditionnement de cellules pendant 3h à 40°C, qui correspond à l'application d'un stress modéré, est donc capable d'activer de nombreux mécanismes de défense (Fig. 1.15) qui pourront protéger les cellules contre des stress subséquents plus intenses, qu'ils soient thermiques ou oxydatifs.



**Figure 1.15 Mécanismes de défenses induits par la thermotolérance (40°C, 3 h).**



## 1.7 Présentation du projet

### 1.7.1 Introduction

L'hyperthermie (39-45°C) est de plus en plus utilisée comme traitement anti-cancer en combinaison avec la radiothérapie, la chimiothérapie et certaines thérapies plus récentes comme l'immunothérapie. De nombreuses études cliniques ont montré son efficacité sur des cancers aussi variés que les tumeurs de la tête et du cou, du sein, du cerveau, de la vessie, du col de l'utérus, du rectum, des poumons, de l'œsophage ainsi que des mélanomes (van der Zee, 2002). L'hyperthermie présente de nombreux avantages : elle cause peu de dommages aux tissus sains environnants la tumeur ainsi que peu d'effets secondaires pour le patient. Elle se montre efficace même contre des tumeurs chimiorésistantes ou radorésistantes. Afin d'espérer pouvoir développer davantage cette méthode, il est important de mieux comprendre les mécanismes moléculaires derrière ces observations cliniques.

La thermotolérance, ou choc thermique modéré, est d'abord apparu comme un effet secondaire indésirable de l'hyperthermie. Comme son caractère transitoire n'en fait pas un obstacle aux traitements thermiques, la thermotolérance modérée (39-40°C) n'a été que peu étudiée. Cependant, il a été prouvé que la thermotolérance (40°C, 3 h) permet de protéger les cellules contre les effets délétères de stress intenses subséquents (chocs thermiques (42/43/45°C) ou stress oxydatif). La thermotolérance permet par exemple d'empêcher l'activation par les chocs thermiques des voies apoptotiques des récepteurs de mort (Bettaieb et Averill-Bates, 2008) et du RE (Bettaieb et Averill-Bates, 2015). La thermotolérance peut également activer des défenses cellulaires telles que les antioxydants. Cet effet protecteur de la thermotolérance (40°C) s'avère donc propice à d'éventuelles applications cliniques, comme par exemple dans la lutte contre les maladies liées au stress oxydatif telles les maladies neurodégénératives. Pour cela, un effort de recherche important doit être effectué. En effet, la plupart des publications qui utilisent des chocs thermiques dits



«modérés» utilisent en fait une température de 42°C, qui est déjà suffisante pour provoquer la mort des cellules. L'impact que peut avoir une température de 40°C, qui représente vraiment une augmentation modérée pour les cellules, n'est que peu étudié (Evans *et al.*, 2015).

### 1.7.2 Hypothèses

Notre première hypothèse est que la thermotolérance induite pendant 3 h à 40°C peut modifier l'équilibre entre les protéines de la famille Bcl-2 afin de protéger les cellules contre l'activation de la voie apoptotique de la mitochondrie par des chocs thermiques (42-43°C).

Notre deuxième hypothèse est que la thermotolérance peut augmenter la génération d'ERO et par conséquent les défenses antioxydantes des cellules afin de leur permettre de résister à des chocs thermiques (42-43°C) subséquents.

### 1.7.3 Objectifs du projet

Des travaux antérieurs au sein de notre laboratoire ont permis de démontrer que l'hyperthermie (42-45°C) induit l'apoptose par la voie extrinsèque (Bettaieb et Averill-Bates, 2008) et les voies intrinsèques (Bettaieb et Averill-Bates, 2005, 2015), après 3 h de traitement chez des cellules HeLa. De plus, la thermotolérance administrée à 40°C pendant 3 h induit une série de réponses de survie chez les cellules, comme par exemple l'augmentation de l'expression d'antioxydants (Pallepati et Averill-Bates, 2010), par un mécanisme encore inconnu. La thermotolérance est aussi capable de protéger en partie les cellules contre l'apoptose induite par l'hyperthermie en diminuant l'activation de nombreux marqueurs de la voie apoptotique des récepteurs de mort et de celle du RE (Bettaieb et Averill-Bates, 2008, 2015 ; Pallepati et Averill-Bates, 2011a, 2011b). En revanche, on connaît peu son impact au niveau de la famille de protéines Bcl-2 impliquées dans la voie de la mitochondrie (Bettaieb et Averill-Bates, 2008 ; Pallepati et Averill-Bates, 2010).

### 1.7.3.1 Objectif général

L'objectif général de ce projet, dans la continuité des études précédentes, est de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la réponse des cellules à l'hyperthermie et dans leur acquisition de la thermotolérance modérée à 40°C.

### 1.7.3.2 Objectifs spécifiques

1. Déterminer si l'hyperthermie (42-43°C, 3 h) et la thermotolérance (40°C, 3 h) peuvent modifier l'expression des protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 impliquées dans la voie mitochondriale de l'apoptose.

2. Déterminer l'implication des ERO lors des étapes précoces (<1 h) de l'induction de la thermotolérance à 40°C.

3. Déterminer le rôle de la voie antioxydante impliquant Nrf2 dans l'induction des mécanismes précoces de protection de la thermotolérance induite à 40°C.

4. Évaluer si les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et/ou le facteur de transcription Nrf2 jouent un rôle dans l'effet protecteur de la thermotolérance (40°C, 3 h) contre l'apoptose induite par le choc thermique (42-43°C, 3 h).

### 1.7.3.3 Choix du modèle

Les cellules de carcinome du col de l'utérus HeLa ont été choisies comme modèle pour cette étude. Cette lignée a été obtenue de l'American Type Culture Collection (ATCC no CCL-2). Ses avantages sont son immortalité, sa prolifération rapide et sa facilité d'utilisation. De par leur provenance, les cellules HeLa sont un bon choix car l'hyperthermie a été prouvée efficace sur les cancers du col de l'utérus. De plus, ce modèle a été utilisé dans la plupart des autres études sur l'hyperthermie de notre laboratoire, il paraît donc normal de continuer avec le même modèle afin de pouvoir comparer les résultats de façon plus cohérente.

## CHAPITRE II

### ARTICLE I

#### 2.1 Préface

Cette section inclut un article scientifique décrivant une partie des expériences effectuées dans le cadre de mon doctorat dans le laboratoire du Dr. Diana Averill-Bates.

Cet article s'intitule **"Mild thermotolerance induced at 40°C protects cells against hyperthermia-induced pro-apoptotic changes in Bcl-2 family proteins"** par Audrey Glory, Ahmed Bettaieb et Diana A. Averill-Bates. Il a été publié dans **International Journal of Hyperthermia, 2014; 30(7): 502–512**. En tant que premier auteur, j'ai réalisé les expériences pour les figures 4 et 5 ainsi que les études statistiques et le texte qui s'y rapportent. J'ai produit la version finale de toutes les figures et du schéma. J'ai également effectué des modifications majeures au niveau du texte de l'article ainsi que de sa conception scientifique, et une importante mise à jour de la bibliographie. De plus, j'ai réalisé les modifications demandées par l'éditeur avant la publication. Ahmed Bettaieb, en tant que co-premier auteur, a réalisé les expériences pour les figures 1 à 3 et a écrit le texte initial qui s'y rapporte. Diana A. Averill-Bates a conçu l'étude et révisé le texte. La bibliographie de l'article a été intégrée à la bibliographie de la thèse.

## 2.2 Article I

### **Mild thermotolerance induced at 40°C protects cells against hyperthermia-induced pro-apoptotic changes in Bcl-2 family proteins**

Audrey Glory<sup>1</sup>, Ahmed Bettaieb<sup>1,2</sup> and Diana A. Averill-Bates\*

Département des sciences biologiques (TOXEN), Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada.

<sup>1</sup>These two authors contributed equally to this work

<sup>2</sup>Present address: Department of Nutrition, University of California, Davis, CA, USA.

\*Corresponding author

Dr Diana A. Averill-Bates

Département des sciences biologiques

Université du Québec à Montréal

CP 8888, Succursale Centre-Ville

Montréal, Québec, Canada H3C 3P8

Tel: (514) 987-3000(4811); Fax: (514) 987-4647

Email: [averill.diana@uqam.ca](mailto:averill.diana@uqam.ca)

Running head: Thermotolerance, hyperthermia, Bcl-2 and apoptosis



Keywords: Hyperthermia, Thermotolerance, Bcl-2 protein, Apoptosis, Mitochondria

### 2.2.1 Résumé

But: Malgré les progrès effectués en clinique, les mécanismes impliqués dans la réponse des cellules à de faibles ou fortes doses d'hyperthermie sont encore méconnus. Cette étude vise à élucider le rôle des protéines de la famille Bcl-2, impliquées dans le contrôle de la voie mitochondriale de l'apoptose, dans l'hyperthermie (42-43°C), ainsi que l'effet protecteur d'une réponse adaptative de survie telle la thermotolérance modérée induite à 40°C.

Méthodes: L'expression des protéines de la famille Bcl-2 a été détectée par Western blot chez des cellules HeLa. L'activité des caspases a été mesurée par spectrofluorimétrie et l'apoptose via la condensation de la chromatine.

Résultats: L'hyperthermie (42-43°C) diminue l'expression totale et mitochondriale des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL, tout en augmentant l'expression des protéines pro-apoptotiques Bax, Bak, Puma et Noxa. L'hyperthermie perturbe donc l'équilibre entre les protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 en faveur des membres pro-apoptotiques. L'hyperthermie provoque également l'activation des caspases-9 et -3, ainsi que la condensation de la chromatine. La perturbation de l'équilibre entre les protéines de la famille Bcl-2 est renversée chez les cellules thermotolérantes (40°C), favorisant de ce fait la survie des cellules. L'inhibiteur de Bcl-2/Bcl-xL ABT-737 sensibilise les cellules à l'apoptose, ce qui indique que les protéines de la famille Bcl-2 jouent un rôle dans l'apoptose induite par les chocs thermiques. La réponse adaptative de thermotolérance modérée (40°C) est toujours capable de protéger les cellules contre l'hyperthermie (42-43°C) lorsque Bcl-2/Bcl-xL sont inhibées.

Conclusions: Ces résultats améliorent les connaissances sur le rôle de la famille de protéines Bcl-2 dans les réponses cellulaires apoptotiques à de fortes doses



d'hyperthermie (42-43°C), ainsi que sur la réponse adaptative de survie induite par de faibles stress, par exemple un stress thermique faible pouvant correspondre à un état fébrile (40°C). Cette étude pourrait constituer le premier pas vers la manipulation des protéines de la famille Bcl-2 dans le but d'augmenter la sensibilité des tumeurs à l'hyperthermie.

**Abstract**

**Purpose:** Despite clinical progress, mechanisms involved in cellular responses to low and high doses of hyperthermia are not entirely clear. This study investigates the role of Bcl-2 family proteins in control of the mitochondrial pathway of apoptosis during hyperthermia at 42-43°C and the protective effect of a low dose adaptive survival response, mild thermotolerance induced at 40°C.

**Materials and Methods:** Levels of Bcl-2 family proteins were detected in HeLa cells by western blotting, caspase activation by spectrofluorimetry and apoptosis by chromatin condensation.

**Results:** Hyperthermia (42-43°C) decreased total and mitochondrial expression of anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xL, while expression of pro-apoptotic proteins Bax, Bak, Puma and Noxa increased. Hyperthermia perturbed the equilibrium between these anti- and pro-apoptotic Bcl-2 family proteins in favor of pro-apoptotic conditions. Hyperthermia also caused activation of caspases-9 and -3, and chromatin condensation. Disruption of the balance between Bcl-2 family proteins was reversed in thermotolerant (40°C) cells, thus favoring cell survival. Bcl-2/Bcl-xL inhibitor ABT-737 sensitized cells to apoptosis, which indicates that Bcl-2 family proteins play a role in hyperthermia-induced apoptosis. The adaptive response of mild thermotolerance (40°C) was still able to protect cells against hyperthermia (42-43°C) when Bcl-2/Bcl-xL were inhibited.

**Conclusions:** These results improve our knowledge of the role of Bcl-2 family proteins in cellular apoptotic responses to lethal doses of hyperthermia (42-43°C), as well as the adaptive survival response induced by exposure to mild stresses, such as a fever temperature (40°C). This study could provide rationale to explore the manipulation of Bcl-2 family proteins for increasing tumor sensitivity to hyperthermia.

### 2.2.2 Introduction

Over the past three decades, there have been major advances in the use of hyperthermia as a tumor-targeted approach in cancer treatment, mainly in combination with radiotherapy, and/or chemotherapy (Horsman et Overgaard, 2007 ; Issels, 2008 ; van der Zee, 2002 ; van der Zee *et al.*, 2008). Hyperthermia (41-45°C) is one of the most effective radiation sensitizers known and can eliminate radio-resistant tumor cells (Horsman et Overgaard, 2007). Hyperthermia displays synergistic interactions with different anticancer drugs including bleomycin, alkylating agents and platinum compounds, and can increase the effectiveness of chemotherapy (Issels, 2008).

Despite important clinical progress with hyperthermia, the molecular mechanisms involved in cellular responses to heat stress remain unclear (Milleron et Bratton, 2007). Hyperthermic temperatures, which are only a few degrees above normal, can cause protein denaturation and aggregation which results in the inactivation of protein synthesis, cell cycle progression and DNA repair processes (Lepock, 2005 ; Richter *et al.*, 2010). Consequently, cells either die by apoptosis and/or necrosis or become sensitized to other cytotoxic modalities such as radiation. Hyperthermia (41 to 45°C) is known to activate apoptosis through the death receptor, mitochondrial (Bettaieb et Averill-Bates, 2005, 2008 ; Milleron et Bratton, 2007) and endoplasmic reticulum (ER) pathways (Shellman *et al.*, 2008).

The preconditioning of cells at elevated temperatures induces thermotolerance, which is associated with accumulation of heat shock proteins (Hsps) (Bettaieb et Averill-Bates, 2005 ; Kregel, 2002 ; Landry *et al.*, 1982 ; Przybytkowski *et al.*, 1986 ; Singh et Hasday, 2013 ; Subjeck *et al.*, 1982). Thermotolerance can render cells resistant to subsequent toxic doses of insults such as heat shock, chemotherapeutic agents, radiation and environmental stress (Gill *et al.*, 1998 ; Martindale et Holbrook, 2002). Thermotolerance is transient and usually declines

within several days. Therefore, there is no interference with clinical use of hyperthermia that is applied at intervals beyond the time frame of thermotolerance. Thermotolerance can be induced by short exposures (e.g. 30 min) to higher temperatures (42-45°C), or by continuous heating (e.g. 3-24 h) at mild, non-lethal temperatures (39.5-41.5°C) (Kregel, 2002 ; Landry *et al.*, 1982 ; Przybytkowski *et al.*, 1986 ; Singh et Hasday, 2013 ; Subjeck *et al.*, 1982). Thermotolerance induced at higher temperatures (>42.5°C) has been widely studied, whereas thermotolerance induced by lower, fever-range temperatures has received little attention. Mild thermotolerance developed at 40°C protected cells against hyperthermia-induced activation of mitochondrial and death receptor-mediated apoptosis (Bettaieb et Averill-Bates, 2005, 2008). The phenomenon whereby cellular defense mechanisms are triggered by low doses of stress such as heat can be of great interest in terms of different pathologies such as ischemia-reperfusion and responses to the toxic effects of drugs and environmental toxins.

The B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) family consists of a large number of proteins that play a pivotal role in apoptosis by determining cell fate upstream of mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) (Brunelle et Letai, 2009 ; Youle et Strasser, 2008). Bcl-2 family proteins are classified into two groups: anti-apoptotic molecules such as Bcl-2, Bcl-2-like 1 (Bcl-xL), Bcl-2-like 2 (Bcl-w), myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1), and pro-apoptotic molecules such as Bcl-2-associated X protein (Bax), Bcl-2 homologous antagonist killer (Bak), BH3-interacting-domain death agonist (Bid), p53-upregulated modulator of apoptosis (Puma) and Noxa. The ratio between levels of pro-apoptotic and anti-apoptotic proteins at the membranes of organelles such as mitochondria is an important determinant in cellular sensitivity to apoptosis (Szegezdi *et al.*, 2009). Anti-apoptotic proteins such as Bcl-2 and Bcl-xL are integral membrane proteins found at subcellular compartments such as mitochondria. They can exert their anti-apoptotic actions by heterodimerization with pro-apoptotic proteins, such as Bax and Bak. Most pro-apoptotic Bcl-2 family

proteins are found in the cytosol and can translocate to organelles such as mitochondria under stress stimuli. Pro-apoptotic proteins such as truncated Bid (tBid) and Puma interact with and enhance the activity of other pro-apoptotic proteins such as Bax and Bak, leading to their activation and MOMP. Other pro-apoptotic proteins such as Bad and Noxa neutralize anti-apoptotic Bcl-2 proteins by displacing sequestered Bax and Bak, facilitating their activation and MOMP.

Apoptosis plays a key role in the maintenance of cellular homeostasis by removing damaged or compromised cells, such as tumor cells. The overexpression of pro-survival members of the Bcl-2 family of proteins (e.g. Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1) occurs in several types of tumors, including haematopoietic and lymphoid cancers, and is often correlated with poor survival (Lessene *et al.*, 2008). The overexpression and anti-apoptosis action of Bcl-2 appears to co-operate to facilitate proto-oncogene *MYC*-driven cell transformation or tumorigenesis (Shortt et Johnstone, 2012).

Although the role of Bcl-2 family proteins in the regulation of apoptosis is well established (Portt *et al.*, 2011), their role during cellular responses to hyperthermia is not entirely clear. This study investigates the effect of hyperthermia at 42°C and 43°C on the expression of several pro-apoptotic and anti-apoptotic Bcl-2 family proteins that are involved in the mitochondrial pathway of apoptosis in HeLa cells. The ability of a low dose adaptive survival response, mild thermotolerance induced at 40°C, to reverse hyperthermia-induced changes in Bcl-2 family proteins is also evaluated. The Bcl-2/Bcl-xL inhibitor ABT-737 will be used to assess the role of these anti-apoptotic proteins in modulating hyperthermia-induced apoptosis. Moreover, the role of reactive oxygen species (ROS) and p53 in mediating changes in the expression of Bcl-2 family proteins will be clarified using the antioxidant PEG-catalase and the p53 inhibitor pifithrin- $\alpha$ , respectively. This study could provide the rationale to explore the manipulation of Bcl-2 family proteins for increasing tumor sensitivity to hyperthermia.



### 2.2.3 Materials and Methods

#### **Cell culture**

Human cervical adenocarcinoma HeLa cells (ATCC no.CCL-2) were cultured as monolayers in Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (PAA Laboratories, Inc. Toronto, ON), L-glutamine (2 mM) and sodium pyruvate (1 mM) (Bettaieb et Averill-Bates, 2005). Cells were maintained in tissue culture flasks (Sarstedt, Saint-Laurent, QC) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Culture medium was replaced with fresh medium 24 h before experiments. To induce thermotolerance, confluent cells were transferred to a CO<sub>2</sub> incubator for 3 h at 40°C ( $\pm 0.1^\circ\text{C}$ ), following a period of 20 min to allow culture medium to reach 40°C. Cells were harvested using 0.5 mg/ml trypsin/0.2 mg/ml EDTA in phosphate-buffered saline (PBS) and washed by centrifugation (1,000 x g, 3 min). There was no loss of cell viability in cells heated at 40°C for 3 h (trypan blue exclusion).

#### **Heat treatment**

Freshly harvested thermotolerant (3 h at 40°C) and non-thermotolerant cells (3 h at 37°C) were heated for 3 h at 42 or 43°C, relative to controls (37°C), in temperature-controlled precision waterbaths ( $\pm 0.02^\circ\text{C}$ ) (Haake D8, Fisher Scientific, Montreal, QC) (Bettaieb et Averill-Bates, 2005). One ml of cell suspension reached a temperature within 0.1°C of the waterbath temperature within 3 min.

#### **Treatment with inhibitors**

The Bcl-2 inhibitor ABT-737 (1  $\mu\text{M}$ ) (Selleck Chemicals, Houston, TX) was added to cells 24 h before experiments. The p53 inhibitor pifithrin- $\alpha$  (10  $\mu\text{M}$ ) and antioxidant polyethylene glycol (PEG)-catalase (300  $\mu\text{M}$ ) were added to cells 1 h and 3 h, respectively, prior to experiments. In Hela cells, PEG-catalase increased

intracellular catalase activity by 47%, from  $3.71 \pm 0.67$  to  $6.20 \pm 0.30$   $\mu\text{mol}/\text{min}/10^6$  cells ( $n = 3$ ).

### **Preparation of whole cell lysates**

Cells were washed by centrifugation ( $1000 \times g$ , 3 min) in buffer A (100 mM sucrose, 1 mM EGTA, 20 mM MOPS, pH 7.4) (Bettaieb et Averill-Bates, 2005 ; Samali *et al.*, 1999). The supernatant was discarded, pelleted cells were resuspended in lysis buffer B [buffer A plus 5% Percoll, 0.01% digitonin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and a cocktail of protease inhibitors: 10  $\mu\text{M}$  aprotinin, 10  $\mu\text{M}$  pepstatin A, 10  $\mu\text{M}$  leupeptin, 25  $\mu\text{M}$  calpain inhibitor I, pH 7.4], and then incubated on ice for 1h. Whole cell lysates were isolated in the supernatant by a 10 min centrifugation step at  $2,500 \times g$  to remove nuclei and unbroken cells.

### **Subcellular fractionation: Isolation of mitochondrial and cytosolic fractions**

Subcellular fractionation was performed as described previously (Bettaieb et Averill-Bates, 2005 ; Samali *et al.*, 1999), with modifications. Cells were washed in buffer A, and then resuspended in buffer B containing 0.1 mM dithiothreitol (DTT). Membranes were broken using a dounce homogenizer (200 strokes/sample). After 30 min incubation on ice, debris and unbroken cells were removed by centrifugation ( $500 \times g$ , 10 min) and then supernatants were centrifuged ( $2,500 \times g$ , 5 min) to separate nuclei (pellet). Supernatants were then centrifuged ( $15,000 \times g$ , 15 min) to separate mitochondria. The pellet containing the mitochondrial fraction was then resuspended in buffer C (300 mM sucrose, 1 mM EGTA, 20 mM MOPS, cocktail of protease inhibitors, pH 7.4) containing 0.1 mM DTT. Supernatants were further centrifuged ( $100,000 \times g$ , 1 h) to separate the cytosolic fraction (supernatant). The purity of cytosolic and mitochondrial fractions was confirmed by Western blotting using glutathione S-transferase (GST- $\pi$ 1) (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) and cytochrome oxidase (Molecular Probes, Eugene, OR), respectively.

### **Western blot analysis**

Proteins (30  $\mu$ g) (Bradford, 1976) were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (8%-15%) (Laemmli, 1970) and immunodetected using primary antibodies (1:1000) recognizing Bcl-2, Bcl-xL, Bax, Bak, Puma and Noxa (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) (Bettaieb et Averill-Bates, 2005). Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated polyclonal secondary antibodies (1:10000) were from Biosource (Camarillo, CA) and Santa Cruz Biotechnology, Inc. Protein expression was analyzed relative to GAPDH loading controls, using a laser scanning densitometer (Alpha Innotech Corp., San Leandro, CA) and Fluorchem and QuantityOne software.

### **Caspase activity**

Caspase activity was determined in cell lysates using the substrates (200  $\mu$ M) Ac-Asp-Glu-Val-Asp-amino-4-methyl-coumarin (Ac-DEVD-AMC) for caspase-3 and Ac-Leu-Glu-His-Asp-amido-4-trifluoromethylcoumarin (Ac-Leu-Glu-His-Asp-AFC) for caspase-9 (Calbiochem) (Bettaieb et Averill-Bates, 2005). The kinetic reaction for caspase activity was followed at respective excitation and emission wavelengths of 380 and 460 nm for caspase-3, and 400 and 505 nm for caspase-9, using a spectrofluorimeter (Spectra Max Gemini, Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

### **Chromatin condensation**

Apoptotic and necrotic cells were visualized by fluorescence microscopy (model IM, Carl Zeiss Canada Ltd, St. Laurent, QC) using Hoechst 33258 (5  $\mu$ g/ml) (Sigma-Aldrich), which binds to condensed chromatin in the nucleus of apoptotic cells, and propidium iodide (PI) (50  $\mu$ g/ml), respectively (Bettaieb et Averill-Bates, 2005). For each condition, at least 300 cells were counted.

## Statistics

Data represent means  $\pm$  SEM from at least 3 independent experiments. Comparisons of mean values with the control were analyzed by the Student's bilateral *t* test. The Bonferroni-Holmes stepwise adjustment was used to control for the Family-wise error rate at a desired level ( $\alpha=5\%$ ). Comparisons among multiple groups were made by one-way ANOVA, which measures the linear contrast of means, with either Bonferroni or Dunnett adjustments. Software used were JMP Statistical Discovery 4.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC) and GraphPad Prism5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). For significant differences,  $P<0.05$ .

#### 2.2.4 Results

##### **Hyperthermia (42-43°C) causes pro-apoptotic changes in total cellular levels of Bcl-2 family proteins.**

The ability of hyperthermia (42-43°C) to alter the total protein expression of several different Bcl-2 family proteins was evaluated in whole cell lysates of HeLa cells (Figure 2.1a). Indeed, hyperthermia caused significant decreases in total expression of the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xL, compared to untreated controls (37°C) (Figures 2.1b, c). In contrast, total cellular expression of the pro-apoptotic proteins Bax, Bak, Puma and Noxa increased during high heat stress at (42-43°C) (Figures 2.1d-g). Hyperthermia (42-43°C) therefore changes the overall cellular ratio between these anti-apoptotic and pro-apoptotic Bcl-2 family proteins, which would sensitize cells to apoptosis.

##### **Mild thermotolerance developed at 40°C reverses hyperthermia-induced pro-apoptotic changes in total cellular expression of Bcl-2 family proteins.**

Next we examined whether mild thermotolerance (40°C) could protect cells against hyperthermia (42-43°C)-induced pro-apoptotic changes in total cellular expression of the Bcl-2 family proteins. Indeed, mild thermotolerance reversed the hyperthermia-induced decreases in total cellular levels of anti-apoptotic proteins Bcl-2 (at 42 and 43°C) and Bcl-xL (at 43°C) (Figures 2.1a-c). Furthermore, the hyperthermia-induced increases in expression of pro-apoptotic proteins Bak, Puma and Noxa were reversed by preconditioning of cells at 40°C (Figures 2.1e-g). The increase in Bax expression was not reversed at 40°C (Figure 2.1d). Therefore, mild thermotolerance (40°C), an adaptive survival response, protected cells against pro-apoptotic changes in total levels of several Bcl-2 family proteins triggered by hyperthermia (42-43°C), thus maintaining cellular homeostasis.



The development of thermotolerance at mild, fever-range temperatures such as 39.5°C to 40°C leads to the accumulation of different heat shock proteins (Hsp) such as Hsp27, Hsp32, Hsp60, Hsp70, Hsp90 and Hsp110 (Bettaieb et Averill-Bates, 2008 ; Ostberg *et al.*, 2002 ; Simon *et al.*, 2000). To our knowledge, it is not known whether mild thermotolerance can alter the expression of Bcl-2 family proteins. Thermotolerance (40°C) itself caused minor changes in the expression of Bcl-2 family proteins in non-heated cells (Figure 2.1). The basal levels of the pro-apoptotic proteins Bax and Puma decrease in thermotolerant (40°C , 3 h) cells compared to normal (37°C, 3 h) cells (Figures 2.1d, f). Cellular levels of Bcl-2, Bcl-xL Bak or Noxa did not change in thermotolerant (40°C , 3 h) cells (Figures 2.1b, c, e, g).

**Hyperthermia (42-43°C) causes subcellular relocalization of Bcl-2 family proteins between mitochondrial and cytosolic compartments.**

The level of protein expression and subcellular localization of different Bcl-2 family proteins is critical to their function during stress-induced apoptosis (Brunelle et Letai, 2009). Hyperthermia (42-43°C) altered the subcellular localization of several Bcl-2 family proteins in HeLa cells (Figures 2.2a, 3a). Levels of anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xL decreased in the mitochondrial fraction, relative to controls (37°C) (Figure 2.2a-c). Hyperthermia (42-43°C) also decreased Bcl-xL levels in the cytosol (Figures 2.3a-b).

For the pro-apoptotic proteins, hyperthermia (42-43°C) caused significant increases in levels of Bax, Bak, Puma and Noxa in the mitochondrial fraction (Figures 2.2a, d-g). There were corresponding decreases in cytosolic levels of Bax, Puma and Noxa, relative to controls (37°C) (Figures 2.3a, c-e). Together, these findings show that hyperthermia (42-43°C) perturbs the equilibrium between anti-apoptotic and pro-apoptotic Bcl-2 family proteins in the mitochondrial compartment, in favor of pro-apoptotic conditions.

### **Thermotolerance developed at 40°C reverses hyperthermia (42-43°C)-induced changes in subcellular localization of Bcl-2 family proteins.**

Subsequently, the ability of mild thermotolerance (40°C) to reverse the hyperthermia (42-43°C)-induced alterations in subcellular distribution of Bcl-2 family proteins was examined (Figures 2.2a, 2.3a). In thermotolerant cells, the hyperthermia (42-43°C)-induced decreases in levels of anti-apoptotic protein Bcl-xL were reversed in the mitochondrial (Figures 2.2a, c) and cytosolic (Figures 2.3a, b) fractions. However at 40°C, mitochondrial levels of Bcl-2 were not restored to control levels (Figures 2.2a, b). For pro-apoptotic proteins, there was pronounced reversal of hyperthermia (42-43°C)-induced changes in mitochondrial (Figures 2.2d, f, g) and cytosolic (Figures 2.3c-e) levels of Bax, Puma and Noxa following mild heat preconditioning at 40°C. Mitochondrial levels of Bak were also reversed at 40°C (Figure 2.2f). Therefore, mild thermotolerance (40°C) protected cells against hyperthermia (42-43°C)-induced alterations in the distribution of diverse Bcl-2 family proteins between the cytosolic and mitochondrial compartments, thus favoring anti-apoptotic conditions and cell survival.

### **Implication of ROS and p53 in the expression of Bcl-2 family proteins during hyperthermia.**

ROS and p53 are known to have a role in the activation of apoptosis (Amaral *et al.*, 2010 ; Simon *et al.*, 2000). To investigate whether these molecules could affect levels of Bcl-2 family proteins, cells were incubated with the antioxidant PEG-catalase (PC) or the p53 inhibitor pifithrin- $\alpha$  (P $\alpha$ ). In whole cell lysates, the hyperthermia (43°C)-induced decrease in Bcl-2 expression was inhibited by PEG-catalase (Figures 2.4a, b). The hyperthermia (43°C)-induced increases in expression of the pro-apoptotic proteins Puma and Noxa were inhibited by both PEG-catalase and pifithrin- $\alpha$  (Figures 2.4e, f). The cellular levels of Bcl-xL (data not shown), Bax and Bak (Figures 2.4c, d) were not affected by these inhibitors.

**Activation of the mitochondrial pathway of apoptosis by hyperthermia (42-43°C).**

Hyperthermia (42-43°C)-induced pro-apoptotic changes in Bcl-2 family proteins at the level of mitochondria were reflected by activation of caspase-9, the initiator caspase in mitochondrial apoptosis (Figure 2.5a). Hyperthermia also activated caspase-3 (Figure 2.5b) and caused apoptosis (chromatin condensation) (Figure 2.5c). Caspase activation and apoptosis were significantly diminished in thermotolerant (40°C) cells (Figures 2.5a-c). Levels of necrotic cells were very low (Figure 2.5d).

**Sensitization to hyperthermia-induced apoptosis by Bcl-2/Bcl-xL inhibitor ABT-737: protective effect of mild thermotolerance (40°C).**

To clarify the role of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins in hyperthermia-induced apoptosis, cells were treated with ABT-737 (Oltersdorf *et al.*, 2005). The activation of caspase-9 (Figure 2.5a) and caspase-3 (Figure 2.5b) by hyperthermia (42-43°C), as well as the induction of apoptosis (Figure 2.5c) were significantly increased by ABT-737. In addition, ABT-737 increased caspase activation and apoptosis in non-heated cells at 37°C (Figures 2.5a-c). The inhibitor had little effect on the level of necrotic cells, which were low (Figure 2.5d). Mild thermotolerance (40°C) proved once more to be effective by decreasing caspase-9 and -3 activation and the induction of apoptosis by hyperthermia (42-43°C), even in the presence of the inhibitor (Figures 2.5a-c).

### 2.2.5 Discussion

This study shows that hyperthermia (42-43°C) perturbed the equilibrium between several anti-apoptotic and pro-apoptotic Bcl-2 family proteins in HeLa cells, thus favoring pro-apoptotic conditions. The equilibrium was perturbed with respect to total Bcl-2 protein expression, as well as their levels in mitochondria. Hyperthermia (42-43°C) triggered overall pro-apoptotic conditions by decreasing total cellular expression of anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xL, while the expression of pro-apoptotic proteins Bax, Bak, Puma and Noxa was increased (Scheme 2.1). The imbalance in the expression of Bcl-2 family proteins in favor of the proapoptotic members resulted in activation of caspase-9, the initiator caspase downstream from mitochondria, and the activation of execution phase events including caspase-3 activation and nuclear chromatin condensation (Scheme 2.1).

The hyperthermia (42-43°C)-induced increases in the expression of Puma and Noxa in HeLa cells were inhibited by pifithrin- $\alpha$ , which indicates that they were dependent on p53 transactivation in the nucleus. Noxa is a p53-inducible gene that antagonizes Mcl-1 and A1, whereas Puma can bind to all of the anti-apoptotic Bcl-2 family proteins (Zhang, L. N. *et al.*, 2013). The induction of Puma expression releases cytosolic p53 from binding to Bcl-xL, which keeps it inactive in the cytosol (Amaral *et al.*, 2010). Once released, cytosolic p53 can then promote Bax oligomerization and translocation to mitochondria. Earlier, we reported that hyperthermia (42-45°C) causes Bax translocation to mitochondria, MOMP and cytochrome c release from mitochondria in HeLa and CHO cells (Bettaieb et Averill-Bates, 2005).

Pifithrin- $\alpha$  is known to block p53-dependent transactivation of apoptotic genes (Komarov *et al.*, 1999). The transcription factors p63 and p73 are homologues of p53. They can activate most of p53's target genes, including those responsible for apoptosis (Dotsch *et al.*, 2010). p73 can directly transactivate PUMA to induce

apoptosis (Melino *et al.*, 2004). p63 and p73 can also promote apoptosis through transcription-independent mechanisms. They can bind to different members of the Bcl-2 family: p63 and p73 can bind to the anti-apoptotic proteins Bcl-xL and Mcl-1 and p63 to the pro-apoptotic protein Bak (Muller *et al.*, 2006). Due to their high degree of similarity, it is possible that the p53 inhibitor pifithrin- $\alpha$  could have an effect on these homologues. Pifithrin- $\alpha$  was shown to act on p73 in zebra fish embryo (Davidson *et al.*, 2008); however, its effect on p63 and p73 in mammalian cells is not known. We cannot rule out the possibility that pifithrin- $\alpha$  is inhibiting not only p53, but also p63 and p73. This would not change the outcome of the data and would mean that the effects are due to the inhibition of several p53 members and not only p53 alone.

The increases in the expression of Puma and Noxa in HeLa cells were inhibited by PEG-catalase, which implies that ROS are involved in their activation by hyperthermia. Hyperthermia can increase the generation of ROS (Bettaieb *et al.*, 2013), which are known to upregulate the expression of Noxa and Puma (Tonino *et al.*, 2011 ; Yu et Zhang, 2008). In addition, the heat-induced decrease in Bcl-2 expression was reversed by PEG-catalase in HeLa cells. ROS can play a pro-apoptotic role by causing down-regulation and degradation of the Bcl-2 protein through the ubiquitin-proteasome pathway (Azad *et al.*, 2010).

Cancer cells have deregulated many of the physiological mechanisms that tightly regulate the different apoptotic signaling pathways in order to evade death by apoptosis (Fulda, 2015). For example, mechanisms have evolved to inactivate pro-apoptotic molecules and many anti-apoptotic factors are expressed at high levels in cancer cells to confer resistance to apoptosis. Therefore, anti-apoptosis proteins such as Bcl-2 promote tumor cell survival, which suggests that impaired apoptosis could be one of the critical steps in tumor formation and progression (Lessene *et al.*, 2008). Furthermore, tumor cells are often inherently insensitive to cancer treatments such as



chemotherapy. Multiple mechanisms appear to be involved, which include the increased expression of drug efflux transporters and cellular detoxification systems, altered drug targets, activation of pro-survival pathways, and enhanced repair of DNA damage (Holohan *et al.*, 2013). Drug resistance could also be linked to defects in the apoptosis machinery, thus favoring tumor cell survival (Fulda, 2015). The results from this study showed that hyperthermia ( $>42^{\circ}\text{C}$ ) caused an imbalance between several members of the Bcl-2 family in favor of pro-apoptotic conditions. The establishment of pro-apoptotic conditions could be beneficial for the sensitization of cancer cells to the cytotoxic effects of radiation and chemotherapy treatments by hyperthermia (Horsman et Overgaard, 2007 ; Issels, 2008 ; van der Zee, 2002 ; van der Zee *et al.*, 2008).

It is not known whether thermotolerant cells induced at mild temperatures such as  $40^{\circ}\text{C}$  are resistant to chemotherapy and radiation. Thermotolerance induced at higher temperatures (e.g.  $43\text{--}45^{\circ}\text{C}$ ) may be associated with different forms of drug resistance including multidrug resistance (MDR) (Hildebrandt *et al.*, 2002). This did not appear to be the case for resistance to radiation.

It is well established that hyperthermia causes protein degradation but can also cause conformational changes to proteins that could expose previously concealed regions (Lepock, 2005). Conformational changes to proteins during hyperthermia could alter binding interactions between different Bcl-2 family proteins and facilitate the activation of Bcl-2 proteins such as Bax and Bak. Indeed, heat ( $43^{\circ}\text{C}$ , 1 h) directly activated recombinant Bax and Bak in isolated mitochondria, resulting in a loss of mitochondrial membrane potential and cytochrome c release (Pagliari *et al.*, 2005).

Several studies have examined the role of Bcl-2 family proteins in hyperthermia-induced cell death, but there is no clear consensus. It was reported that hyperthermia causes apoptosis through a caspase-2/Bid pathway with activation of Bax/Bak-dependent mitochondrial apoptosis in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) (Bonzon

*et al.*, 2006). Another study reported that hyperthermia-induced apoptosis was dependent on Bim through a Bax/Bak-dependent pathway in MEFs (Mahajan *et al.*, 2014). These different pathways appear to act independently and in parallel and/or their respective roles could depend on cell type and severity of heat stress. In Jurkat cells, however, caspase-9 activation was essential for hyperthermia-induced apoptosis, but not caspase-8 or caspase-2 (Shelton *et al.*, 2010). The anti-apoptotic protein Mcl-1 appears to be a critical heat-sensitive step leading to Bax activation in the human acute lymphoblastic T-cell line (PEER) (Stankiewicz *et al.*, 2009).

The overexpression of several anti-apoptotic proteins protected cells against hyperthermia-induced apoptosis in several cell types. Bcl-2 overexpression inhibited apoptosis induced by hyperthermia (44°C, 40 min) in mouse hematopoietic cell lines (Strasser et Anderson, 1995). Different leukemic hematopoietic cells were less sensitive to hyperthermia-induced apoptosis, due to an imbalance in expression of the Bcl-2 family proteins in favor of pro-apoptotic Bcl-2 proteins (Setroikromo *et al.*, 2007). Overexpression of Bcl-xL in murine IL-3-dependent prolymphoid progenitor cells (FL5.12) prevented the induction of apoptosis by acute heat stress (42°C, 1 h) (Robertson *et al.*, 1997). Jurkat cells overexpressing Bcl-2/Bcl-xL were resistant to apoptosis induced by hyperthermia (44°C, 1 h) (Shelton *et al.*, 2010).

While the exposure to higher doses of heat (> 42°C) is cytotoxic to cancer cells (van der Zee, 2002), the preconditioning of cells by lower doses of heat induces thermotolerance (Bettaieb et Averill-Bates, 2005 ; Kregel, 2002 ; Landry *et al.*, 1982 ; Przybytkowski *et al.*, 1986 ; Singh et Hasday, 2013 ; Subjeck *et al.*, 1982). This study shows that mild thermotolerance induced at 40°C in HeLa cells reversed the hyperthermia (42-43°C)-induced disruption in the anti-apoptosis/pro-apoptosis balance between Bcl-2 family proteins. This protective, pro-survival effect occurred at both the cellular and mitochondrial levels. Low dose exposure to different stresses, including heat shock, can lead to adaptive survival responses that enable cells and

organisms to continue normal function in the face of a toxic insult (Holsapple et Wallace, 2008). Adaptive responses often involve the induction of defense systems (e.g. Hsps, antioxidants, anti-apoptotic proteins, etc.) that allow cells to protect themselves against different toxic and environmental stresses (Davies, 2000). However, if the adaptive response cannot protect the cell against an adverse stress exposure, then the damaged cell will be removed, for example, by apoptosis.

In mild thermotolerant (40°C) HeLa cells, the protective reversal of changes in the balance between pro-apoptotic and anti-apoptotic Bcl-2 family proteins may be related to Hsps. The Hsps 27, 32, 60, 72, 90 and 110 were induced at 40°C in HeLa cells (Bettaieb et Averill-Bates, 2005). Hsps have a complex role in the regulation of apoptosis (Beere, 2005). Hsp70 is able to modulate Bcl-2-dependent apoptosis (Mosser et Morimoto, 2004). Hsp70 and Hsp27 can inhibit apoptosis by interfering with events upstream of MOMP that ultimately suppress the activation of Bax, thereby inhibiting the release of pro-apoptotic factors such as cytochrome c from mitochondria (Stankiewicz *et al.*, 2005 ; Steel *et al.*, 2004). This appears to involve Hsp70-mediated inhibition of c-Jun N-terminal kinase (JNK), which can activate pro-apoptotic Bcl-2 family proteins such as tBid that are able to promote Bax and Bak activation and induce MOMP (Gabai *et al.*, 2002 ; Milleron et Bratton, 2007 ; Paul *et al.*, 2002). More recently, the overexpression of Hsp70 was shown to stabilize Mcl-1 protein levels and prevented Bax activation in heat-shocked cells (Stankiewicz *et al.*, 2009). This resulted from reduced Mcl-1 ubiquitination and degradation, as well as enhanced Mcl-1 expression. In addition, Hsp70 overexpression allowed for new synthesis to replace degraded Mcl-1 (Stankiewicz *et al.*, 2009). Hyperthermia (40-44°C)-induced apoptosis was inhibited by pre-inducing Hsp70 in H9c2 cells (Hsu *et al.*, 2013). Findings from these different studies suggest that several Hsps could prevent the activation and mitochondrial translocation of pro-apoptotic proteins such as Bax and tBid, and maintain levels of anti-apoptotic proteins such as Bcl-2 and Mcl-1, and hence mitochondrial integrity, during hyperthermia.



The use of inhibitors of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins has long been considered for bypassing the immortality of cancer cells. The small molecule inhibitor ABT-737 is a Bcl-2 homology domain 3 (BH3)-mimetic that binds strongly to Bcl-2, Bcl-xL and Bcl-w through an interaction mediated by the BH3 domain (Andreu-Fernandez *et al.*, 2013 ; Oltersdorf *et al.*, 2005 ; Rooswinkel *et al.*, 2012). This interaction releases pro-apoptotic proteins such as Bax/Bak from the complexes they form with their anti-apoptotic counterparts, allowing them to trigger apoptosis. This study shows that ABT-737 alone activated caspase-9 and caspase-3 and triggered apoptosis in HeLa cells. ABT-737 enhanced caspase-9 and caspase-3 activation at 42 and 43°C and sensitized cells to hyperthermia-induced apoptosis. ABT-737 also sensitized MEFs to hyperthermia (44°C, 1.5 h) (Mahajan *et al.*, 2014). Since the pro-apoptotic protein Bim is critical for hyperthermia-induced killing in MEFs, it was suggested that ABT-737 could liberate Bim from Bcl-2 or Bcl-xL, which in turn could activate Bax and/or Bak. These studies emphasize the importance of the anti-apoptotic role of Bcl-2 during hyperthermia-induced apoptosis. ABT-737 is effective as a single agent against cancer cell lines including leukemias, lymphomas, neuroblastoma and small cell lung carcinoma, primary tumor cells and animal models, but it is also useful in combination with other anticancer treatments such as radiation and chemotherapy (Cragg *et al.*, 2009 ; Fang *et al.*, 2011 ; Oltersdorf *et al.*, 2005). The oral analog of ABT-737 (ABT-263, Navitoclax) has now entered Phase I/II clinical trials (Gandhi *et al.*, 2011 ; Wilson *et al.*, 2010). The combined use of hyperthermia with an inhibitor such as ABT-737 could be a promising strategy to trigger apoptosis for the elimination of tumor cells. However, our results show that ABT-737 was unable to block the protective effects of thermotolerance against hyperthermia (42-43°C)-induced apoptosis in HeLa cells. This suggests that ABT-737 cannot sensitize cells that overexpress Hsps to hyperthermia. In addition, ABT-737 does not inhibit the anti-apoptotic proteins Mcl-1 or A1 (Rooswinkel *et al.*, 2012). Given that many tumors overexpress Hsps

(Calderwood *et al.*, 2006), strategies that combine hyperthermia and ABT-737 with approaches that target Hsps and Mcl-1 could be envisaged.

### **Conclusion**

This study establishes that (1) lethal hyperthermia (42-43°C) created an imbalance between members of the Bcl-2 family of proteins in favor of pro-apoptotic conditions at the cellular and mitochondrial levels, (2) thermotolerance, induced by mild hyperthermia (40°C), reversed the imbalance between pro-apoptotic and anti-apoptotic Bcl-2 proteins that was triggered by hyperthermia (42-43°C), (3) inhibition of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins by ABT-737 sensitized HeLa cells to hyperthermia-induced apoptosis. These findings improve our understanding about hyperthermia-induced apoptosis, as well as the protective ability of adaptive survival responses against toxic stresses.



**Acknowledgments**

The authors thank Mr Bertrand Fournier (Service de consultation en analyse de données, Université du Québec à Montréal) for statistical analyses.

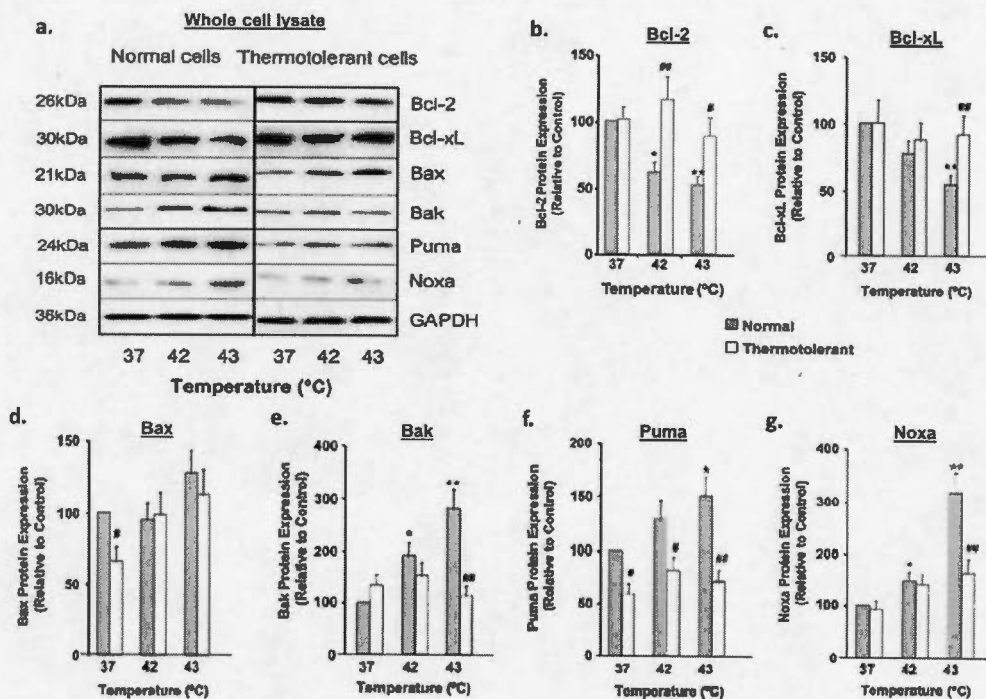
**Declaration of Interest**

The University Mission of Tunisia in North America provided PhD scholarship support (to A.B.), the Society for Thermal Medicine (STM) awarded a student travel award to attend the 30th Annual conference of STM in April 2013 (to A.G.). Contract grant sponsor was NSERC Canada; Contract grant number: 36725-11 (to D.A.A.B.). The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

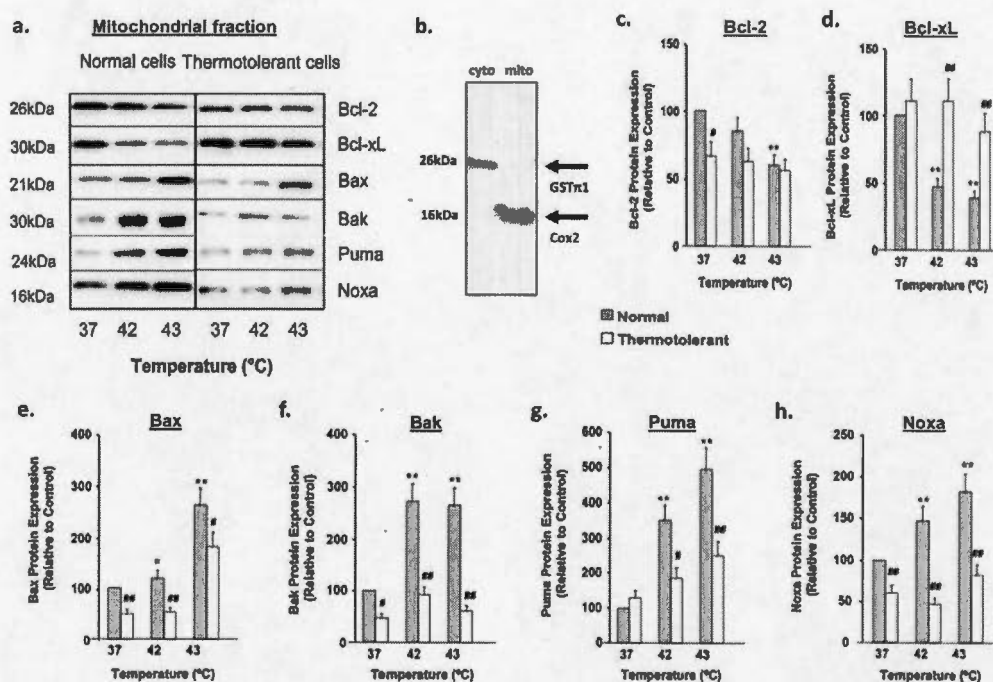
## Abbreviations

AFC: Amino trifluorocoumarin; Bad: Bcl-2-associated death promoter; Bak: Bcl-2 homologous antagonist killer; Bax: Bcl-2-associated X protein; Bcl-2: B cell lymphoma 2; Bcl-w: Bcl-2-like 2; Bcl-xL: Bcl-2-like 1; Bid: BH3-interacting-domain death agonist; D-MEM: Dulbecco's modification of Eagle's medium; DTT: Dithiothreitol; EDTA: Ethylene diamine tetraacetic acid; EGTA: Ethylene glycol tetraacetic acid; ER: Endoplasmic reticulum; GST- $\pi$ 1: glutathione S-transferase; HeLa: Human cervical carcinoma cells; HRP: Horseradish peroxidase; Hsps: Heat shock proteins; JNK: c-Jun N terminal kinase; MEF: Mouse embryonic fibroblast; Mcl-1: Myeloid cell leukemia-1; MOMP: Mitochondrial outer membrane permeabilization; MOPS: 3-(N-morpholino)-propane sulfonic acid; Pa: Pifithrin- $\alpha$ ; PBS: phosphate-buffered saline; PC: PEG-Catalase; PEG: Polyethylene glycol; PI : Propidium iodide; PMSF: Phenylmethylsulfonyl fluoride; Puma: p53-upregulated modulator of apoptosis; ROS: Reactive oxygen species; SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; SEM: Standard error of mean; tBid: truncated Bid.

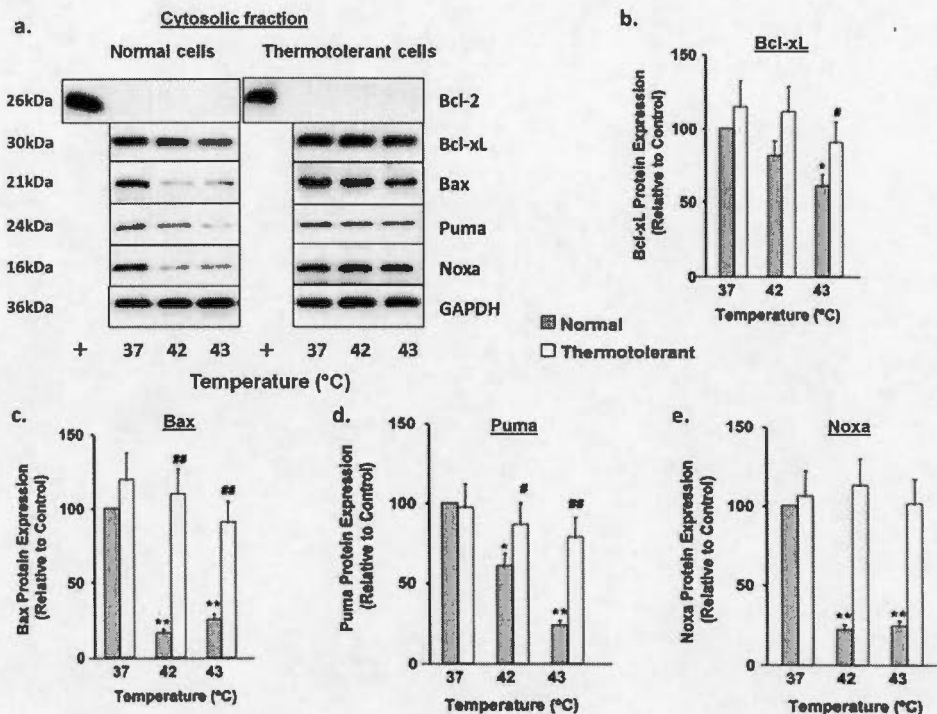
## 2.2.6 Figures



**Figure 2.1 Heat shock (42-43°C) alters the cellular balance between pro-apoptosis and anti-apoptosis Bcl-2 family proteins: protective role of thermotolerance (40°C).** Non-thermotolerant (3h at 37°C) and thermotolerant (3 h at 40°C) cells were exposed to heat shock (42-43°C) for 3h. (a) Western blots for protein expression in whole cell lysates are representative of at least three independent experiments. Means and SEM are shown for densitometric analysis of proteins: (b) Bcl-2; (c) Bcl-xL; (d) Bax; (e) Bak; (f) Puma; (g) Noxa. Protein expression in thermotolerant and non-thermotolerant cells was normalized to GAPDH loading controls and is relative to non-thermotolerant controls at 37°C (100%). For significant differences between heated (42-43°C) cells and the control (37°C):  $P<0.05$  (\*),  $P<0.001$  (\*\*). For significant differences between thermotolerant and non-thermotolerant cells at each specific temperature:  $P<0.05$  (#),  $P<0.001$  (##).



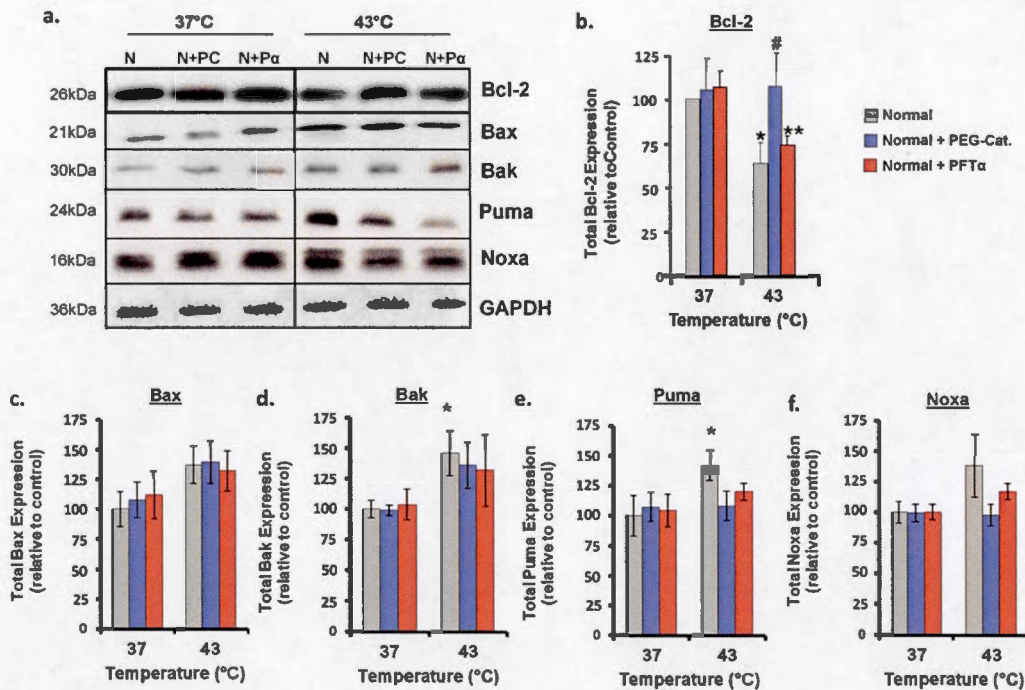
**Figure 2.2 Heat shock (42-43°C) causes relocalization of Bax, Bak, Bim, Puma and Noxa to mitochondria while expression of Bcl-2 and Bcl-xL decreases: reversal by thermotolerance (40°C).** Non-thermotolerant (3h at 37°C) or thermotolerant (3 h at 40°C) cells were heated (42-43°C) for 3h. (a) Western blots for protein expression in mitochondrial fractions are representative of at least three independent experiments. (b) The purity of cytosolic and mitochondrial fractions was confirmed using GST-p1 and cytochrome c oxidase (Cox2) antibodies, respectively. The average purity of the cytosolic fraction from at least four separate experiments was  $89.72 \pm 1.49\%$  and that of the mitochondrial fraction was  $92.33 \pm 2.57\%$ . Means and SEM are shown for densitometric analysis of (c) Bcl-2, (d) Bcl-xL, (e) Bax, (f) Bak, (g) Puma, (h) Noxa. Protein expression is relative to non-thermotolerant controls at 37°C (100%). For significant differences between heated (42-43°C) cells and control (37°C),  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.001$  (\*\*). For significant differences between thermotolerant and non-thermotolerant cells at each specific temperature,  $p < 0.05$  (#),  $p < 0.001$  (##).



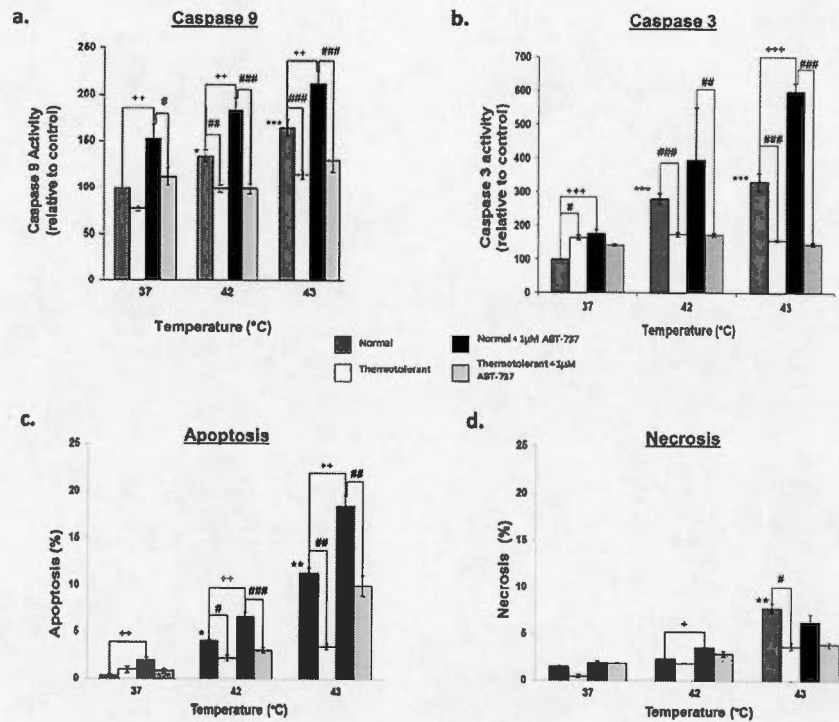
**Figure 2.3 Decreased expression of Bcl-2 family proteins in cytosolic fractions during heat shock (42-43°C): reversal by 40°C thermotolerance.** Thermotolerant (3h at 40°C) and non-thermotolerant (3 h at 37°C) cells were heated (42-43°C) for 3 h. (a) Western blots for protein expression in cytosolic fractions are representative of at least three independent experiments. + is a positive control for Bcl-2 expression in whole cell lysates. Means and SEM are shown for densitometric analysis of: (b) Bcl-xL; (c) Bax; (d) Puma; (e) Noxa. Protein expression is relative to non-thermotolerant controls at 37°C (100%). For significant differences between hyperthermia-treated (42-43°C) cells and the control (37°C):  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.001$  (\*\*). For significant differences between thermotolerant and non-thermotolerant cells at each specific temperature:  $P < 0.05$  (#),  $P < 0.001$  (##).



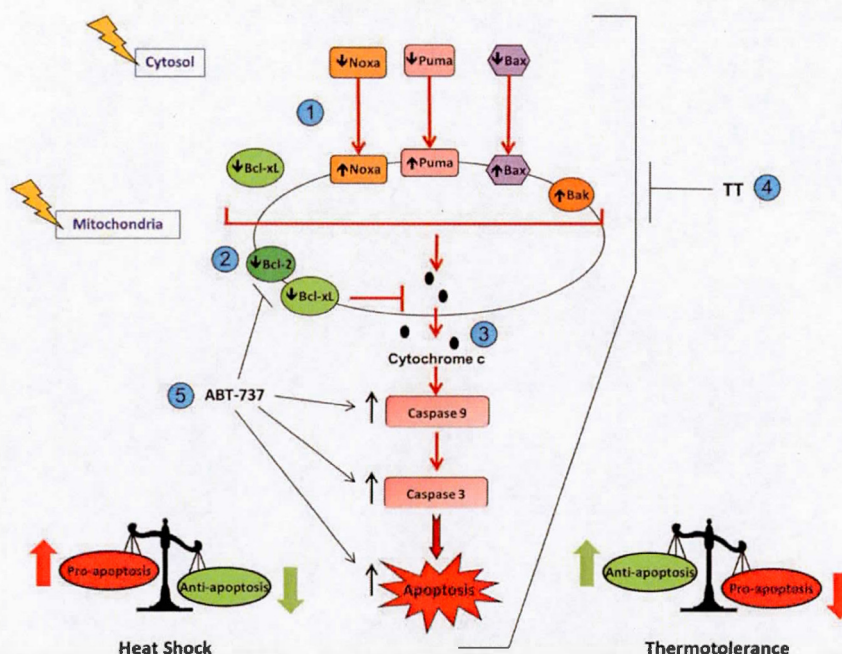
Whole cell lysate



**Figure 2.4 Hyperthermia-induced down-regulation of Bcl-2 involves ROS, and up-regulation of Puma and Noxa involves p53 and ROS.** Cells were pretreated with PEG-catalase (PC) or pifithrin- $\alpha$  (Pa) and then heated (43°C) for 3 h. (a) Western blots for protein expression in whole cell lysates are representative of at least three independent experiments. Means and SEM are shown for densitometric analysis of proteins: (b) Bcl-2; (c) Bax; (d) Bak; (e) Puma; (f) Noxa. Protein expression was normalized to GAPDH loading controls and is relative to non-treated controls at 37°C. For significant differences between heated (43°C) cells and the control (37°C):  $P < 0.05$  (\*). For significant differences between treated and non-treated cells at each specific temperature:  $P < 0.05$  (#).



**Figure 2.5 Bcl-2 inhibitor ATB-737 enhances hyperthermia-induced apoptosis: protective role of mild thermotolerance (40°C).** Relative activities of caspase-9 (a) and caspase-3 (b), and levels of apoptosis (c) and (d) necrosis in thermotolerant (3 h at 40°C) and non-thermotolerant (3 h at 37°C) cells, with or without pretreatment with ABT-737 (1 µM). Means ± SEM are from at least three independent experiments. For significant differences between heated (42-43°C) cells and the non-thermotolerant control (37°C): P<0.05 (\*), P<0.001 (\*\*). For significant differences between thermotolerant and non-thermotolerant cells at each temperature: P<0.05 (#), P<0.001 (##). For cells with or without ABT-737: P<0.05 (+), P<0.01 (++), P<0.001 (+++).



**Scheme 2.1 Heat shock (42-43°C) alters the pro-apoptosis/anti-apoptosis balance in Bcl-2 family proteins during apoptosis in HeLa cells.** (1) Heat shock induced translocation of Bax, Puma and Noxa to mitochondria. (2) Heat shock decreased levels of Bcl-2 and Bcl-xL at mitochondria. (3) Heat shock increased the pro-apoptosis/anti-apoptosis balance in Bcl-2 family proteins at mitochondria, which led to cytochrome c release, activation of caspase-9 and caspase-3, and execution of apoptosis. (4) Thermotolerance (TT) at 40°C decreased the translocation of Bax, Noxa and Puma to mitochondria, and inhibited cytochrome c release, caspase activation and apoptosis. (5) Inhibition of the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xL by ABT-737 preventing them from interfering with heat shock-induced apoptosis.

## CHAPITRE III

### ARTICLE II

#### 3.1 Préface

Cette section inclut un article scientifique décrivant une partie des expériences effectuées dans le cadre de mon doctorat dans le laboratoire du Dr. Diana Averill-Bates.

Ce deuxième article s'intitule "**The antioxidant transcription factor Nrf2 contributes to the protective effect of mild thermotolerance (40°C) against heat shock-induced apoptosis**" par Audrey Glory et Diana A. Averill-Bates. Cet article a été soumis au journal **Free Radical Biology and Medicine**. Suite aux avis des évaluateurs des expériences supplémentaires ont été réalisées et des modifications ont été apportées au texte. En tant que premier auteur, j'ai réalisé toutes les expériences ainsi que les études statistiques et le texte qui s'y rapportent. J'ai rédigé l'intégralité du texte, effectué la recherche bibliographique et la mise en forme de l'article. Diana A. Averill-Bates a conçu l'étude, révisé le texte et apporté les modifications demandées par le journal. La bibliographie de l'article a été intégrée à la bibliographie de la thèse.

### 3.2 Article II

#### **The antioxidant transcription factor Nrf2 contributes to the protective effect of mild thermotolerance (40°C) against heat shock-induced apoptosis**

Audrey Glory and Diana A. Averill-Bates\*

Département des sciences biologiques (TOXEN), Université du Québec à Montréal,  
Montréal, Québec, Canada.

\*Corresponding author

Dr Diana A. Averill-Bates

Département des sciences biologiques

Université du Québec à Montréal

CP 8888, Succursale Centre-Ville

Montréal, Québec, Canada H3C 3P8

Tel: (514) 987-3000(4811); Fax: (514) 987-4647

Email: [averill.diana@uqam.ca](mailto:averill.diana@uqam.ca)

**Keywords:** Nrf2, thermotolerance, oxidative stress, reactive oxygen species, apoptosis, p53



**Highlights:**

- Mild thermotolerance (40°C) increases cellular levels of ROS, after 30 - 60 min of exposure.
- Increased ROS generation leads to activation of the Nrf2 antioxidant pathway.
- Nrf2 activation is diminished by inhibition of tumor suppressor p53, indicating a positive interaction between Nrf2 and p53.
- Nrf2 activation increases the protective ability of mild thermotolerance (40°C) against heat shock (42°C)-induced apoptosis, whereas Nrf2 inhibition reverses protection by thermotolerance.

### 3.2.1 Résumé

L'exposition des cellules à de faibles doses de stress induit des réponses adaptatives de survie qui protègent les cellules contre une exposition subséquente à un stress toxique. La capacité des cellules à résister à de fortes doses de stress à la suite d'une exposition à de faibles doses de stress thermique à 40°C est connue sous le nom de thermotolérance modérée. La thermotolérance modérée induit une augmentation de l'expression des protéines de choc thermique et des antioxydants, sans que les facteurs initiateurs de ces réponses ne soient connus. Cette étude a pour but de comprendre le rôle de la voie antioxydante de Nrf2 dans l'acquisition de la thermotolérance modérée à 40°C, ainsi que d'évaluer si la voie de Nrf2 pourrait être impliquée dans l'effet protecteur de la thermotolérance contre l'apoptose induite par des chocs thermiques (42°C). Lors du préconditionnement des cellules à 40°C, l'expression du facteur de transcription Nrf2 augmente après 15 à 60 min à 40°C. Cette augmentation est suivie par une hausse de l'activité de la catalase après 1 h, ainsi que par une hausse des transcrits codants pour les gènes cibles de Nrf2 catalase, MnSOD, GCL, HO-1 et Hsp70. Ces augmentations sont augmentées par l'activateur de Nrf2 oltipraz tandis qu'elles sont annulées par un shRNA ciblant Nrf2. Les niveaux d'oxydants (peroxydes, superoxyde et oxyde nitrique) augmentent après 30 à 60 min à 40°C. Ces niveaux sont diminués par l'oltipraz et augmentés par le shRNA contre Nrf2. L'augmentation de l'expression de Nrf2 et de l'activité de la catalase à 40°C sont inhibées par l'antioxydant PEG-catalase et par l'inhibiteur de p53 pifithrin- $\alpha$ . Ces résultats montrent que la thermotolérance modérée (40°C) augmente les niveaux cellulaires d'oxydants, qui à leur tour vont activer Nrf2 et la catalase, l'une de ses cibles. De plus, Nrf2 contribue à l'effet protecteur de la thermotolérance contre l'apoptose induite par des chocs thermiques (42°C). En effet, l'activation de Nrf2 par l'oltipraz va améliorer l'effet protecteur de la thermotolérance alors que l'inhibition de Nrf2 peut en partie annuler les effets de la thermotolérance. L'amélioration des connaissances sur les différents mécanismes de défense que la thermotolérance

(40°C) peut activer pourrait permettre l'utilisation de la thermotolérance dans le traitement des maladies liées aux stress cellulaires.

## Abstract

The exposure of cells to low doses of stress induces adaptive survival responses that protect cells against subsequent exposure to toxic stress. The ability of cells to resist subsequent toxic stress following exposure to low dose heat stress at 40°C is known as mild thermotolerance. Mild thermotolerance involves increased expression of heat shock proteins and antioxidants, but the initiating factors in this response are not understood. This study aims to understand the role of the Nrf2 antioxidant pathway in acquisition of mild thermotolerance at 40°C, and secondly, whether the Nrf2 pathway could be involved in the protective effect of thermotolerance against heat-shock (42°C)-induced apoptosis. During cell preconditioning at 40°C, protein expression of the Nrf2 transcription factor increased after 15 to 60 min. In addition, levels of the Nrf2 targets MnSOD, catalase, heme oxygenase-1 and glutamate cysteine ligase increased at 40°C. Levels of these Nrf2 targets were enhanced by Nrf2 activator oltipraz and decreased by shRNA targeting Nrf2. Levels of pro-oxidants (peroxides, superoxide and nitric oxide) increased after 30 to 60 min at 40°C. Oxidant levels were decreased by oltipraz and increased by knockdown of Nrf2. Increased Nrf2 expression and catalase activity at 40°C were inhibited by the antioxidant PEG-catalase and by p53 inhibitor pifithrin- $\alpha$ . These results show that mild thermotolerance (40°C) increases cellular pro-oxidant levels, which in turn activate Nrf2 and its target catalase. Moreover, Nrf2 contributes to the protective effect of thermotolerance against heat-shock (42°C)-induced apoptosis, because Nrf2 activation by oltipraz enhanced thermotolerance, whereas Nrf2 knockdown partly reversed thermotolerance. Improved knowledge about the different protective mechanisms that mild thermotolerance can activate is crucial for the potential use of this adaptive survival response to treat stress-related diseases.

### 3.2.2 Introduction

The past four decades have seen the emergence of a novel cancer therapy: hyperthermia (Suit et Shwayder, 1974 ; van der Zee, 2002). This technique uses heat (42-45°C), in combination with conventional treatments such as radiotherapy and chemotherapy, to induce apoptosis in cancer cells (Horsman et Overgaard, 2007 ; Issels, 2008 ; Muckle et Dickson, 1973). The clinical use of hyperthermia has allowed the discovery of another heat-related phenomenon: thermotolerance (Henle *et al.*, 1978). Indeed, when patients are treated with hyperthermia they tend to develop a resistance to heat (Marquez *et al.*, 1994), either through the direct effect of the hyperthermia treatment (exposure to a higher temperature (42-45°C) for a short time) or through the fevers that can be occasioned by the treatment (exposure to a mild temperature (39-40°C) for a longer time) (Singh et Hasday, 2013 ; Subjeck *et al.*, 1982). Fortunately, this heat resistance is temporary and does not affect success of combined cancer treatments that use hyperthermia.

Heat resistance, known as thermotolerance, became of interest to better understand how cells can resist the stress caused by exposure to an otherwise lethal temperature. Previous work reported that mild thermotolerance induced during 3 h at 40°C has been shown to increase cellular resistance to apoptosis induced either by heat shock (42-43°C) (Bettaieb et Averill-Bates, 2005, 2008, 2015 ; Glory *et al.*, 2014), or oxidative stress (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Pallepati et Averill-Bates, 2010, 2011a, 2011b). This is a thorough cytoprotection because it acts against the three main signaling pathways of apoptosis, through mitochondria (Glory *et al.*, 2014 ; Kennedy et Jager *et al.*, 2014), the ER (Bettaieb et Averill-Bates, 2015 ; Kennedy et Mnich *et al.*, 2014 ; Pallepati et Averill-Bates, 2011a) and death receptors (Bettaieb et Averill-Bates, 2008 ; Kennedy et Jager *et al.*, 2014). Mild thermotolerance (40°C) also raised levels of cellular defenses against oxidative stress, including the antioxidants manganese superoxide dismutase (MnSOD), catalase, glutathione and glutamate cysteine ligase (GCL) (Pallepati et Averill-Bates, 2010). To date, the induction of cellular defenses



such as antioxidants has been detected in cells rendered thermotolerant by exposing them to 40°C for longer periods of time (3 h to 24 h). However, the initiating event(s) in this protective survival response that transpire prior to 3 h at 40°C is/are not presently known. The rise in cellular levels of antioxidants suggests that the stress arising from the temperature increase from 37°C to 40°C, while mild, is strong enough to trigger increased production of reactive oxygen species (ROS) such as superoxide and peroxides. A likely candidate responsible for early onset of mild thermotolerance at 40°C would be the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) pathway.

During the past 10 years, Nrf2 has become a widely-studied transcription factor in areas as diverse as cancer (Geismann *et al.*, 2014 ; Kansanen *et al.*, 2013 ; Mitsuishi *et al.*, 2012 ; Rotblat *et al.*, 2012), neurodegenerative diseases (Johnson et Johnson, 2015), cardiovascular diseases (Cominacini *et al.*, 2015) and epilepsy (Carmona-Aparicio *et al.*, 2015). These diseases have all been related to oxidative stress. Nrf2 has been recognized to play a major role in the cellular antioxidant response. Therefore, disruption of this pathway would create major disturbances of the redox balance, and thus cellular homeostasis, and could be a causal factor in these diseases (Wakabayashi *et al.*, 2010). Under normal conditions, Nrf2 is bound to the repressor protein Kelch ECH associating protein 1 (Keap1), which orchestrates the degradation of Nrf2 by the ubiquitin proteasome pathway (Kansanen *et al.*, 2013). In response to increased cellular levels of free radicals and pro-oxidants, several Keap1cysteine residues become either succinylated or oxidized, which releases Nrf2 and allows its translocation to the nucleus (Itoh *et al.*, 2015 ; Kansanen *et al.*, 2013 ; Suzuki et Yamamoto, 2015). Once in the nucleus, Nrf2 binds to small Maf proteins through their leucine zipper dimerization domain and together they bind to Antioxidant Response Elements (AREs) via the DNA-binding domain of small Mafs (Blank, 2008). AREs are enhancers found in the promoter region of genes coding for a multitude of antioxidant proteins such as NADPH:quinone oxidoreductase 1

(NQO1), catalase, heme-oxygenase-1 (HO-1), glutamate cysteine ligase (GCL), superoxide dismutase (SOD) and heat shock protein 70 (Hsp70) (Girnun *et al.*, 2002). Nrf2 binding to AREs activates the transcription and translation of these antioxidants, thus strengthening cellular defenses against free radicals and pro-oxidants to avoid oxidative stress (Espinosa-Diez *et al.*, 2015).

The tumor suppressor p53 has recently been attributed with an antioxidant role through the regulation of genes coding for antioxidant proteins such as MnSOD and glutathione peroxidase 1 (GPx1) (Budanov, 2014). Moreover, evidence have reported the existence of a crosstalk between Nrf2 and p53 (Rotblat *et al.*, 2012). On one hand, the feedback loop between these proteins appears to be positive: the Nrf2 target NQO1 interacts with p53 to block the degradation of p53 by the proteasome, while the p53 target p21 binds to Keap1, preventing the latter from sending Nrf2 to the proteasome (Rotblat *et al.*, 2012). To the contrary, negative regulation between Nrf2 and p53 has also been found: the Nrf2 target mouse double minute 2 (MDM2) promotes p53 degradation whereas p53 appears to be a transcriptional repressor of Nrf2 target genes (Rotblat *et al.*, 2012). These findings suggest that while crosstalk exists between Nrf2 and p53, whether it is positive or negative appears to depend on the cellular context (stress, disease, differentiation, etc...) (Chen *et al.*, 2012 ; Fan *et al.*, 2014 ; Rotblat *et al.*, 2012).

This study aims to understand the role of the Nrf2 antioxidant pathway in the onset of mild thermotolerance at 40°C, and whether this could be associated with an early increase in the generation of reactive oxidants. The relationship between Nrf2 and p53 is also evaluated in the context of induction of mild thermotolerance. Secondly, this work aims to determine whether the Nrf2 pathway could be involved in the protective effect of thermotolerance against heat-shock (42°C)-induced apoptosis. This study should improve understanding of the mechanisms responsible

for the activation of cellular defenses against reactive oxidants during the early onset of mild thermotolerance at 40°C.

### 3.2.3 Materials and methods

#### Cell culture

Human cervical adenocarcinoma HeLa cells (ATCC no. CCL-2) were cultured as monolayers in Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (PAA Laboratories, Inc. Toronto, ON) (Pallepati et Averill-Bates, 2011a). Cells were maintained in tissue culture flasks (Sarstedt, Saint-Laurent, QC) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Upon reaching 90% confluence, cells were harvested using 0.5 mg/ml trypsin/0.2 mg/ml EDTA in phosphate-buffered saline (PBS) and washed by centrifugation (1,000 x g, 3 min).

#### Heat treatment

To induce thermotolerance, confluent cells were transferred to a CO<sub>2</sub> incubator for different times, from 5 min to 3 h at 40°C ( $\pm 0.1^\circ\text{C}$ ), following a period of 5 to 20 min to allow culture medium to reach 40°C (Pallepati et Averill-Bates, 2011a). There was no loss of cell viability in cells heated at 40°C for 3 h (trypan blue exclusion). Freshly harvested thermotolerant (3 h at 40°C) and non-thermotolerant cells (3 h at 37°C) were heated for 3 h at 42 or 43°C, relative to controls (37°C), in temperature-controlled precision waterbaths ( $\pm 0.02^\circ\text{C}$ ) (Haake D8, Fisher Scientific, Montreal, QC). One ml of cell suspension reached a temperature within 0.1°C of the waterbath temperature within 3 min.

#### Chemical treatments

The p53 inhibitor pifithrin- $\alpha$  (10  $\mu\text{M}$ ) (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) orthenitric oxide synthase (NOS) inhibitor L-N<sup>G</sup>-nitroarginine methyl ester (L-NAME) (100  $\mu\text{M}$ ) (Sigma-Aldrich) were added to cells 1 h prior to experiments.

Polyethylene glycol (PEG)-catalase (300 U/ml) or PEG-SOD (100 U/ml) (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) were added to cells 3 h prior to experiments. The catalase inhibitor aminotriazole (20 mM) (Sigma-Aldrich) was added to cells 2 h prior to experiments. Sodium pyruvate (1 mM) (Sigma-Aldrich) was added to cells 10 min prior to experiments. The Nrf2 activator oltipraz (50  $\mu$ M) (Sigma-Aldrich) was added to cells 24 h prior to experiments.

### **Preparation of whole cell lysates**

Cells were washed by centrifugation (1000 x g, 3 min) in buffer A (100 mM sucrose, 1 mM EGTA, 20 mM MOPS, pH 7.4) (Glory *et al.*, 2014 ; Samali *et al.*, 1999). The supernatant was discarded, pelleted cells were resuspended in lysis buffer [20 mM MOPS, 10% glycerol, 80 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 5 mM EGTA, 1 mM EDTA, 2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 20 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , 1 mM NaF, 1% Triton X-100, 1 mM dithiothreitol (DTT) and a cocktail of protease inhibitors (10  $\mu$ M aprotinin, 10  $\mu$ M pepstatin A, 10  $\mu$ M leupeptin, 25  $\mu$ M calpain inhibitor I and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)) (*Complete Mini*, Roche, Mississauga, ON), pH 7], and then placed at -80°C overnight (Bettaieb et Averill-Bates, 2008). After thawing on ice for 30 min with periodic vortexing, whole cell lysates were isolated in the supernatant by a 10 min centrifugation step at 2,500 x g to remove nuclei and unbroken cells (Pallepati et Averill-Bates, 2011a).

### **Subcellular fractionation: Isolation of cytosolic and nuclear fractions**

Nuclear and cytosolic fractions were obtained according to the nuclear extraction protocol of ThermoFisher Scientific (Life Technologies Inc., Burlington, ON). Cells were washed in cold PBS and then resuspended in hypotonic buffer [20 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 7.4] and left on ice for 15 min. Ten % Triton X-100 was added and cells were vortexed at maximum speed for 10 sec. The broken cells were then centrifuged (3 000 x g, 10 min) to separate nuclei (pellet). The supernatant was kept as the cytosolic fraction. The pellet was resuspended in cell



extraction buffer [10 mM Tris-HCl, 2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 100 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 1 mM EDTA, 10 % glycerol, 1 mM EGTA, 0.1 % SDS, 1 mM NaF, 0.5 % deoxycholate, 20 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , 1 mM PMSF, and a cocktail of protease inhibitors (10  $\mu\text{M}$  aprotinin, 10  $\mu\text{M}$  pepstatin A, 10  $\mu\text{M}$  leupeptin, 25  $\mu\text{M}$  calpain inhibitor I) (*Complete Mini*, Roche, Mississauga, ON), pH 7.4] and placed on ice for 30 min with periodic vortexing. Samples were then centrifuged (14 000  $\times$  g, 30 min). The supernatant was kept as the nuclear fraction.

### Western blot analysis

Proteins (50  $\mu\text{g}$ ) were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (12%) and immunodetected using a primary antibody (1:1000) recognizing Nrf2 or a primary antibody (1:10,000) recognizing phospho-Nrf2 (Ser<sup>40</sup>) (Abcam Inc, Toronto, ON), and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated polyclonal secondary antibody (1:10000) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA). Protein expression was analyzed relative to GAPDH loading control, using a laser scanning densitometer (Fusion Fx7, MBI, Montreal, QC) and QuantityOne software (Bio-Rad, Mississauga, ON) (Glory *et al.*, 2014).

### Measurement of cell death

Apoptotic and necrotic cells were counted by flow cytometry (Accuri C6, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) using the FL-1 and FL-3 detectors, respectively for FITC-Annexin V (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (Molecular Probes, Life technologies, Carlsbad, CA, USA) and propidium iodide (PI) (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Measurements were taken in 10,000 cells per condition (Bettaieb et Averill-Bates, 2008).

### ROS generation

Cells were incubated with peroxy yellow (PY1) (15  $\mu\text{M}$ ) (Sigma-Aldrich) for 60 min, dihydroethidium (DHE) (5 mM) or diaminofluorescein (DAF) (5 mM) (Molecular Probes, Life technologies) for 30 min, or Mitosox (5  $\mu\text{M}$ ) for 10 min at

37°C. Peroxy yellow was used in the presence of L-NAME (100  $\mu$ M) to distinguish between levels of peroxides and peroxynitrite (Dickinson *et al.*, 2010 ; Grisham, 2013 ; Lippert *et al.*, 2011). DHE and Mitosoxare qualitative indicators of cellular and mitochondrial levels of superoxide, respectively (Kalyanaraman *et al.*, 2012). DAF estimates intracellular nitric oxide levels (Damasceno *et al.*, 2014). Levels of these different ROS were detected by flow cytometry (Accuri C6) in 10,000 cells using the FL-1, FL-2 and FL-3 detectors and corrected for autofluorescence from unlabeled cells (Pallepati et Averill-Bates, 2010).

### **Immunofluorescence**

Cells attached in 35 mm petri dishes (Ibidi, Madison, WI) were fixed using 3.7 % formaldehyde and rendered permeable with 5 % serum, 0.1 % Triton and 5 % bovine serum albumin (BSA). They were then incubated overnight at +4°C with a primary antibody against Nrf2, followed by incubation for 1 h at room temperature with a secondary anti-mouse antibody labeled with Alexa-488 (Molecular Probes, Life technologies, Carlsbad, CA, USA). Fluorescence emitted by the Alexa-488 probe and representing the Nrf2 protein was visualized by confocal microscopy (model A1+, Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA), in at least 200 cells.

### **Short hairpin RNA**

Cells were grown in 6-well plates and allowed to reach 75 % confluence on the day of transduction. The short hairpin RNA (shRNA) construct targeting Nrf2 and the non-targeting shRNA were encapsidated in lentiviral particles (Santa Cruz Biotechnology). Transduction was performed according to the manufacturer's protocol. The concentration of lentiviral particles used was 5  $\mu$ l per  $0.5 \times 10^6$  cells and concentration of puromycin used for the selection of positive clones was 4  $\mu$ g/ml.

### **Catalase activity**

Cells ( $0.5 \times 10^6$ ) were lysed by sonication (twice for 10 sec) (Vibra Cell, Sonics & Materials, Inc., Danbury, CT, USA) in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) and centrifuged (14,000 rpm, 15 min) to obtain a clear extract (Pallepati et Averill-Bates, 2010). The dosage was performed using a solution of 19 mM  $H_2O_2$  containing the clear cellular extract in a final volume of 310  $\mu$ l of 50 mM phosphate buffer. Catalase activity in the cellular extract was measured as  $H_2O_2$  consumption/min, by detecting the decrease in absorbance at 240 nm using a microplate reader (Infinite M1000 PRO, Tecan, San Jose, CA, USA). One unit was defined as  $\mu$ mol of peroxide consumed/min/ $10^6$  cells, obtained using the initial velocity from the linear slope of the curve. Catalase activity was normalized to controls and displayed as fold difference.

### **RNA extraction and quantitative PCR (q-PCR)**

Total RNA was extracted from cells using the RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Mississauga ON, Canada). Reverse transcription to obtain cDNA was performed using iScript Reverse Transcriptase supermix (Bio-Rad). q-PCR detection and expression analysis of genes in real-time was then carried out using the SensiFAST SYBR No-ROX kit (Bioline, Taunton, MA, USA). The probes used were: GAPDH (FW 5' ACC CAC TCC TCC ACC TTT GA 3'; RV 5' CTG TTG CTG TAG CCA AAT TCG T 3'), Catalase (FW 5' GAT AGC CTT CGA CCC AAG CA 3'; RV 5' ATG GCG GTG AGT GTC AGG AT 3'), HO-1 (FW 5' ATG ACA CCA AGG ACC AGA GC 3'; RV 5' GTG TAA GGA CCC ATC GGA GA 3'), Hsp70 (FW 5' CAC CAC CTA CTC CGA CAA CCA 3'; RV 5' GCC CCT AAT CTA CCT CCT CAA TG 3'), manganese SOD (MnSOD) (FW 5' ACA GGC CTT ATT CCA CGT CT 3'; RV 5' CAG CAT AAC GAT CGT GGT TT 3') and GCL (FW 5' TAT AAT GAC ATC GAC TTG ACG 3'; RV 5' TTC CCA TTG ATG ATG GTG TC 3'). All kits were used according to the manufacturer's protocol.

**Statistics**

Data represent means  $\pm$  SEM from at least 3 independent experiments. Comparisons among multiple groups were made by either one-way or two-way ANOVA, which measures the linear contrast of means, with Bonferroni adjustment to control for the family-wise error rate at a desired level ( $\alpha=5\%$ ). Software used was GraphPad Prism5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). For significant differences,  $P<0.05$ .

### 3.2.4 Results

#### **Mild thermotolerance (40°C) protects cells against heat shock (42°C)-induced apoptosis**

The ability of mild thermotolerance developed during 3 h at 40°C to protect HeLa cells against apoptosis induced by heat shock (42°C) was evaluated using Annexin V labeling (Figure 3.1). Heat shock at 42°C caused a significant, more than 3-fold increase in apoptosis, in non-thermotolerant cells. Thermotolerant (40°C) cells experienced a significant 25% decrease in the level of apoptosis at 42°C, compared to non-thermotolerant cells. However, mild thermotolerance (40°C) caused partial, but not complete inhibition of heat-shock-induced apoptosis.

#### **Preconditioning of cells at 40°C increases cellular expression of Nrf2**

During the early stages (<3 h) of preconditioning at 40°C, we hypothesized that the temperature increase from 37°C to 40°C could increase the expression of cellular defense systems such as the Nrf2 antioxidant pathway. Therefore, Nrf2 expression was measured by immunofluorescence in cells during preconditioning at 40°C compared to normal (37°C) cells (Figure 3.2a-b). Indeed, Nrf2 expression increased after only 15 min at 40°C to reach a maximum (2.5-fold) increase after 1 h, before gradually decreasing after 2-3 h (Figure 3.2a-b). This general increase in Nrf2 expression was accompanied by its translocation to the nucleus, evidenced by merge of the Nrf2-Alexa488 signal with that of Hoechst in the nuclei (Figure 3.2a). Translocation of Nrf2 and its phosphorylated form p-Nrf2 to the nucleus was confirmed by Western blotting (Figure 3.2c-2f). Protein expression of Nrf2 gradually decreased in the cytosol (Figure 3.2c) during 5 to 60 min of heating at 40°C, while expression in the nucleus increased (Figure 3.2d). There was a tendency for a gradual decrease in cytosolic expression of p-Nrf2 (Figure 3.2e) and a corresponding increase in the nuclear fraction (Figure 3.2f) at 40°C.



**Levels of Nrf2 targets increase during preconditioning of cells at 40°C**

The enzymatic activity of the Nrf2 target catalase was measured during preconditioning of cells at 40°C (Figure 3.3a). Catalase activity increased significantly after 1 to 3 h at 40°C, compared to the control at 37°C (Figure 3.3a). The maximum increase (1.8-fold) in catalase activity occurred after 2 h at 40°C. Nrf2 knockdown with a targeted shRNA completely abolished the increase in catalase activity at 40°C (Figure 3.3a). Protein expression of Nrf2 decreased to about 50 % of the control level using the shRNA (Figure 3.3b). Nrf2 expression was not affected by the scrambled shRNA control (Figure 3.3b). Oltipraz, a potent Nrf2 activator, caused a significant increase in catalase activity at 37°C, and further increases occurred during preconditioning of cells at 40°C (Figure 3.3a). Oltipraz caused a close to 3-fold increase in Nrf2 expression in HeLa cells (Figure 3.3c). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was used as a positive control for induction of Nrf2 expression (Figure 3.3c). These data show that the increase in catalase activity at 40°C was dependent on Nrf2. The protein expression of NQO1, another target of Nrf2, did not change at 40°C (data not shown). Several other targets of Nrf2 were induced during preconditioning of cells at 40°C (Figure 3.3d-h). qPCR expression analysis of genes in real-time showed induction of genes for catalase (Figure 3.3d), HO-1 (Figure 3.3e), MnSOD (Figure 3.3g) and GCL (Figure 3.3h) during 30 min to 3 h of heating at 40°C, compared to controls at 37°C. Induction of Hsp70 at 40°C was relatively low (Figure 3.3f), compared to that of the four antioxidant genes. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was used as a positive control for the induction of these five genes (Figure 3.3d-h). Induction of all of these 5 genes was abolished by the shRNA targeting Nrf2, while their expression was induced by oltipraz (Figure 3.3d-h).

### **Preconditioning of cells at 40°C increases levels of ROS**

We subsequently determined whether the activation of Nrf2 at 40°C could arise from increased generation of pro-oxidants (ROS) during earlier stages (<3 h) of preconditioning of cells at 40°C. To confirm this idea, increased cellular levels of several different ROS were detected at 40°C (Figures 3.4a-d). Levels of fluorescence for DHE (total superoxide) (Figure 3.4a), MitoSox (mitochondrial superoxide) (Figure 3.4b), Peroxy yellow (PY1) (peroxides) (Figure 3.4c) and DAF (nitric oxide) (Figure 3.4d) gradually increased after 30 min to 3 h at 40°C, compared to their respective controls at 37°C.

### **Cellular levels of ROS at 40°C are dependent on Nrf2 expression**

Given that Nrf2 expression affects levels of antioxidant target genes (Figure 3.3d-e, 3.3g-h), it is likely that the increased generation of pro-oxidants at 40°C would be dependent on Nrf2. Increased Nrf2 expression would be expected to decrease ROS levels at 40°C, whereas Nrf2 suppression would likely have the opposite effect. Indeed, oltipraz-stimulated overexpression of Nrf2 completely inhibited increases in levels of superoxide (Figure 3.4a-b), peroxides (Figure 3.4c) and nitric oxide (Figure 3.4d) at 40°C to levels of controls at 37°C. On the contrary, Nrf2 knockdown using a targeted shRNA enhanced levels of superoxide, peroxides and nitric oxide (Figures 3.4a-d). These data show that altered expression of Nrf2 modulates levels of ROS that are generated during preconditioning of cells at 40°C.

Given that pro-oxidants could be involved in the activation of Nrf2 during preconditioning of cells at 40°C, we evaluated whether Nrf2 induction could be inhibited by antioxidant treatment. Indeed, PEG-catalase significantly decreased Nrf2 activation by 20 %, after 1 h at 40°C (Figure 3.5a-b). This shows that activation of Nrf2 at 40°C is dependent on increased generation of pro-oxidants. These data suggest that preconditioning of cells at 40°C increases production of pro-oxidants, which in turn lead to enhanced expression of the antioxidant transcription factor Nrf2.

and increased activity of its target genes. Moreover, the increased levels of ROS generated at 40°C were dependent on cellular Nrf2 expression.

### **Inhibition of p53 counteracts the increase in Nrf2 expression**

Crosstalk between Nrf2 and p53 in the antioxidant response has been reported (Rotblat et al., 2012). Therefore, the ability of p53 inhibitor pifithrin- $\alpha$  (P $\alpha$ ) to alter expression of Nrf2 was investigated (Figure 3.5). Pifithrin- $\alpha$  inhibited the increase in Nrf2 expression after 1 h at 40°C by 35% (Figure 3.5a-b). In addition, the increases in generation of peroxides (Figure 3.4b) and catalase activity at 40°C (Figure 3.5c) were inhibited by pifithrin- $\alpha$ . This decrease in antioxidant response resulted in further enhancement of the production of pro-oxidants at 40°C (Figure 3.4c).

### **Role of ROS and Nrf2 in heat shock (42°C)-induced apoptosis**

The induction of apoptosis by heat shock at 42°C was partially inhibited by 35 % by the antioxidant PEG-catalase (Figure 3.6a, left panel), but was not affected by the antioxidant PEG-SOD and NOS inhibitor L-NAME. When catalase was inhibited using aminotriazole, there was a 20 % increase in apoptosis (Figure 3.6a). When Nrf2 expression was enhanced by oltipraz, there was a significant 40 % decrease in heat shock-induced apoptosis (Figure 3.6b, left panels). Decreased expression of Nrf2 using a targeted shRNA had the opposite effect and significantly increased apoptosis by 30 % (Figure 3.6b). This shows that heat shock-induced apoptosis at 42°C was dependent on peroxides and Nrf2.

### **ROS and Nrf2 are partially responsible for the protective anti-apoptotic effect of mild thermotolerance acquired at 40°C**

Because ROS levels are increased during preconditioning of cells at 40°C, they could play a role in the protective anti-apoptotic effect of mild thermotolerance. Mild thermotolerance (3 h, 40°C) afforded a significant protective effect against 42°C

heat shock-induced apoptosis (Figure 3.6a, right panels). This protective anti-apoptotic effect was reversed by L-NAME and the antioxidant PEG-SOD, but was not affected by PEG-catalase. However, when catalase was inhibited using aminotriazole, the protective effect of mild thermotolerance was reversed and marked sensitization (55 %) of cells to heat shock-induced apoptosis occurred (Figure 3.6a, right panels).

Given that the Nrf2 pathway is activated during preconditioning of cells at 40°C, we determined whether the protective effect of thermotolerance against heat shock (42°C)-induced apoptosis is dependent on Nrf2. In thermotolerant cells (3 h, 40°C), stimulation of Nrf2 expression by oltipraz provided further protection against apoptosis (Figure 3.6b, right panels). Apoptosis induced at 42°C in oltipraz-treated cells decreased by 50% compared to non-treated thermotolerant cells. On the other hand, decreased expression of Nrf2 using a shRNA reversed thermotolerance (Figure 3.6a, right panels) and significantly increased (+75 %) cellular sensitivity to heat shock-induced apoptosis, similar to that of non-thermotolerant cells. Interestingly, thermotolerance (40°C) was also reversed (+45 %) when p53 was inhibited using pifithrin- $\alpha$  (Figure 3.6b). These results suggest that peroxides, Nrf2 and p53 all play a role in the protective effect of mild thermotolerance at 40°C.

### 3.2.5 Discussion

This study shows that mild thermotolerance developed at 40°C triggers an increase in cellular levels of ROS such as superoxide, peroxides and nitric oxide. This in turn leads to an increase in expression of the antioxidant transcription factor Nrf2, which raises levels of antioxidants such as catalase. This cascade of events likely contributes to the protective effect of mild thermotolerance (40°C) against heat shock (42°C)-induced apoptosis in HeLa cells. Several studies reported that heat shock at lethal temperatures from 42 to 45°C increased the generation of pro-oxidants in HeLa (Bettaieb et Averill-Bates, 2008), prostate cancer (Moriyama-Gonda *et al.*, 2000) and neuronal cells (El-Orabi *et al.*, 2011), as well as rat intestinal epithelial cell monolayers (Flanagan *et al.*, 1998). The increase in pro-oxidants at these elevated temperatures would likely be neutralized by the rise in cellular antioxidant defenses that is triggered by mild thermotolerance at 40°C.

#### Role of Nrf2 in the acquisition of mild thermotolerance at 40°C

Nrf2 is a transcription factor that can be activated by several types of stress, including oxidative stress, electrophilic stress (O'Connell et Hayes, 2015), xenobiotics (Geismann *et al.*, 2014), caloric restriction (Bocci et Valacchi, 2015), ischemia reperfusion injuries (Cominacini *et al.*, 2015), etc. Activation of Nrf2 allows its translocation to the nucleus where it initiates the transcription of Antioxidant Response Elements (AREs) present on the promoter region of several antioxidant genes to initiate their transcription. These genes code for hemoxygenase-1 (HO-1) (Kansanen *et al.*, 2013), subunits of  $\gamma$ -glutamyl cysteine synthetase ( $\gamma$ -GCS) (Fan *et al.*, 2014), glutathione reductase (GR) (Mitsuishi *et al.*, 2012), glutathione peroxidase (GPx) (Bocci et Valacchi, 2015), glutathione S-transferase (GST) (Kansanen *et al.*, 2013), superoxide dismutase (SOD) (Carmona-Aparicio *et al.*, 2015), catalase (Girnun *et al.*, 2002 ; Glorieux *et al.*, 2015), thioredoxin (Trx) (Mitsuishi *et al.*, 2012), thioredoxin reductase (TrxR) (Mitsuishi *et al.*, 2012), peroxiredoxins (Prxs)



(Carmona-Aparicio *et al.*, 2015) and NADP(H) : quinone oxidoreductase 1 (NQO1) (O'Connell et Hayes, 2015), among others. Several of these antioxidants, namely MnSOD, catalase, glutathione and  $\gamma$ -GCS, were upregulated in thermotolerant cells following exposure to mild heat stress at 40°C for 3 h (Pallepati et Averill-Bates, 2010). This led to our hypothesis that the induction of these antioxidants by low dose heat stress could be mediated by activation of the Nrf2 signaling pathway. Indeed, levels of several Nrf2 targets such as catalase, MnSOD, GCL and HO-1 were increased at 40°C.

Nrf2 and its phosphorylated form both increased in nuclear fractions of HeLa cells during acquisition of mild thermotolerance at 40°C. As an activator of Nrf2, oxidative stress causes liberation of Nrf2 from its inhibitor Keap1, allowing Nrf2 to translocate to the nucleus and bind to the ARE and activate gene expression (Niture *et al.*, 2014). The phosphorylation of Nrf2 at Ser<sup>40</sup> by protein kinase C (PKC $\delta$ ) is required for its release from Keap1. Nrf2 phosphorylation was involved in regulation of the expression of certain genes, such as NQO1, but phosphorylation was not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of ARE-mediated NQO1 gene expression (Niture *et al.*, 2014).

### **Links between ROS and Nrf2 during the onset of mild thermotolerance at 40°C**

The link between ROS and Nrf2 in the context of mild thermotolerance at 40°C was assessed using two approaches. First of all, induction of Nrf2 expression at 40°C was evaluated in cells with altered levels of ROS. Secondly, cellular expression of Nrf2 was altered to assess its influence on ROS catabolism at 40°C. The cellular origin of heat-induced ROS is unknown, although the respiratory chain in mitochondria is a likely source (Ott *et al.*, 2007). Heat stress at 40°C is likely to increase generation of superoxide from the electron transport chain. Subsequently, superoxide undergoes dismutation to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Therefore, in the first approach, the ROS that was targeted was H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The antioxidants PEG-catalase (PC) and sodium pyruvate

were used to decrease cellular levels of  $H_2O_2$  (Lord-Fontaine et Averill-Bates, 2002). PEG-catalase converts  $H_2O_2$  to oxygen and water, while sodium pyruvate undergoes a decarboxylation reaction with  $H_2O_2$ . The induction of Nrf2 expression at 40°C, as well as activity of its target catalase, were both diminished when cellular  $H_2O_2$  levels were lower due to antioxidant action of PEG-catalase or sodium pyruvate. This suggests that ROS such as  $H_2O_2$  were responsible for Nrf2 activation at 40°C. These results are in agreement with other studies where activation of Nrf2 was linked to cellular ROS content (Cullinan et Diehl, 2006 ; Gan et Johnson, 2014 ; Zhang, H. *et al.*, 2015). In the second approach, cellular Nrf2 expression was increased using oltipraz, whereas its expression was decreased using a Nrf2 shRNA. Oltipraz is a chemoprotective agent that acts by disrupting the Keap1-Nrf2 complex, thus allowing nuclear translocation of Nrf2 and activation of ARE promoters on its target genes (Kensler *et al.*, 2003). Enhancement of Nrf2 expression by oltipraz markedly attenuated the 40°C-induced increase in generation of the ROS (superoxide, peroxides and nitric oxide). On the other hand, shRNA-mediated knockdown of Nrf2 resulted in enhanced generation of ROS at 40°C. These results show that ROS generation in the context of mild thermotolerance at 40°C was dependent on cellular expression of Nrf2. Increased levels of ROS at 40°C in HeLa cells were detected using four different fluorescent probes. However, there are limitations for the detection of ROS using fluorescent probes [see reviews, (Damasceno *et al.*, 2014 ; Grisham, 2013 ; Kalyanaraman *et al.*, 2012)]. The fluorescent probes are not necessarily entirely specific. Peroxy yellow is an improvement for the detection of peroxides compared to former probes (Dickinson *et al.*, 2010 ; Lippert *et al.*, 2011), particularly combined with a NOS inhibitor. Peroxy yellow underestimates peroxide production in cells. DHE and MitoSox are qualitative rather than quantitative indicators of superoxide production (Kalyanaraman *et al.*, 2012). DAF is converted to fluorescent DAF triazol but the mechanisms involved are not entirely clear (Damasceno *et al.*, 2014). DAF detects intracellular nitrosative processes that may be

dependent on superoxide, but it does not react directly with peroxynitrite. Despite these limitations, our results suggest that levels of ROS were increased during the development of mild thermotolerance at 40°C.

### **Role of Nrf2 and p53 in the acquisition of mild thermotolerance (40°C)**

The link between Nrf2 and p53 was investigated in the context of mild thermotolerance (40°C) using pifithrin- $\alpha$ , an inhibitor that is known to block transactivation of p53 target genes (Komarov *et al.*, 1999). In the context of mild thermotolerance, Nrf2 activation at 40°C as well as activity of its target catalase was diminished by p53 inhibition. This implies a positive feedback loop between the two proteins, where neither protein is inhibiting the other in this context. In fact, the crosstalk between Nrf2 and p53 is complex because it depends on the cellular context. When ROS levels are high, p53 is activated and inhibits Nrf2 target genes, as well as promoting cell cycle arrest and apoptosis (Chen *et al.*, 2012 ; Fan *et al.*, 2014). On the other hand, low ROS levels maintain "normal" cellular levels of p53, which activate Nrf2 and the expression of its targets genes (Chen *et al.*, 2012 ; Fan *et al.*, 2014). In the context of mild thermotolerance, Nrf2 activation at 40°C was diminished by p53 inhibition, which implies the partial involvement of p53. During mild thermotolerance, Nrf2 would therefore be activated both by p53 and directly through the increase in ROS generation at 40°C. In addition, p53 inhibition decreased peroxide generation at 40°C. This could be explained by the fact that p53-mediated activation of Nrf2 is disrupted by p53 inhibitor pifithrin- $\alpha$ , which would block the Nrf2-mediated increase in antioxidants during mild heat stress at 40°C. This would result in increased production of ROS.

The protective effect of mild thermotolerance (40°C) against heat shock (42°C)-induced apoptosis was also reversed by p53 inhibitor pifithrin- $\alpha$ . This reversal of thermotolerance could be caused by a direct effect of p53 or through its modulation of Nrf2 expression. In fact, cellular levels of Nrf2 had a big impact on the

protective effect of mild thermotolerance. Stimulation of Nrf2 expression by oltipraz protected thermotolerant cells against heat shock (42°C)-induced apoptosis, thus amplifying the protective effect of mild thermotolerance. On the contrary, Nrf2 knockdown using a targeted shRNA reversed thermotolerance and sensitized thermotolerant cells to heat shock-induced apoptosis, similar to p53 inhibition, confirming the important role of the Nrf2 antioxidant pathway during the onset of mild thermotolerance at 40°C.

### **Links between mild thermotolerance acquired at 40°C and ROS**

Several links exist between thermotolerance and oxidative stress. Mild thermotolerance (40°C) increased cellular levels of heat shock proteins (Hsps) such as Hsp27, Hsp32, Hsp60, Hsp70, Hsp90 and Hsp110 in HeLa cells (Bettaieb et al., 2005). Increased expression of Hsp70 and Hsp110 was induced *in vivo* by fever-range (39.5-40°C, 6 h) whole-body hyperthermia in mice (Ostberg *et al.*, 2002). Hsp27 is able to provide cellular protection against stresses such as heat shock and oxidative stress that cause protein damage (Arrigo, 2001 ; Landry *et al.*, 1989). ROS cause reversible and irreversible protein damage, such as modification of cysteine, methionine and histidine residues, or protein carbonylation, which can affect protein stability. Proteins that are damaged by carbonylation are generally resistant to degradation and accumulate as protein aggregates (Niforou *et al.*, 2014). These large, insoluble oxidative stress-derived protein aggregates can activate Hsp70. Moreover, activation of Hsps causes their separation from their complex with the transcription factor heat-shock factor 1 (HSF1), allowing them to bind damaged proteins. This allows translocation of HSF1 to the nucleus where it initiates further transcription of Hsps (Niforou *et al.*, 2014).

### **Connections between the Nrf2 and HSP stress responses**

There is considerable crosstalk between the transcription factors Nrf2 and Hsf1 for cellular adaptation and protection [reviewed by (Dayalan Naidu *et al.*, 2015).

Activation of Nrf2 counteracts oxidative and electrophilic stress whereas activation of Hsf1 prevents protein misfolding (Zhang *et al.*, 2011). The combined action of these two transcription factors allows for cytoprotection and the maintenance of normal cellular functions under different conditions of stress. Nrf2 and Hsf1 each regulate distinct cell survival pathways, namely the heat shock response and the Keap1/Nrf2/ARE pathway, but they share several transcriptional targets such as HO-1 (also known as Hsp32), Hsp70, activating transcription factor-3 (ATF-3) and the autophagy cargo protein p62. Another commonality is that both Hsf1 and Nrf2 affect the cellular redox and play a role in reduced glutathione (GSH) homeostasis. Nrf2 exerts a strong influence on levels of the important intracellular antioxidant GSH, by regulating GSH biosynthesis through GCL and its regeneration from GSSG through GPX, GR and NADPH-generating enzymes such as glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (PGD). Furthermore, levels of G6PD and GSH were increased by upregulation of the Hsf1 target Hsp25/27.

Another link is that a wide range of electrophiles such as  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehydes (e.g. 4-hydroxy-2-nonenal), oxidants such as  $H_2O_2$  and  $NO^\bullet$ , and oxidized lipids can activate both the Nrf2 and Hsf1 pathways (Sato *et al.*, 2011). However, activation of the Hsf/Hsp system by sulfhydryl reactive compounds, in particular the induction of Hsp70, necessitated higher concentrations of electrophiles than those required for activation of the Nrf2 pathway (Zhang *et al.*, 2011). It was proposed that at lower concentrations, activators are sensed first by the cysteines of Keap1, whereas at higher concentrations, activators also affect the function of Hsp90 and Hsp70, which are negative regulators of Hsf1, and subsequently activate the heat shock response (Dayalan Naidu *et al.*, 2015). This leads to the idea that Nrf2 is a first line of defense and that Hsps are activated later (Zhang *et al.*, 2011). This is supported by the fact that the gene coding for Hsp70 is part of an ARE target of Nrf2 (No *et al.*, 2014). This model could also be applied to mild thermotolerance, where this study shows



that the Nrf2 pathway is induced after 15 min at 40°C, reaching a peak at 1 h. Under these conditions, the induction of Hsps occurred after 2 h of exposure of cells to 40°C (Bettaieb et Averill-Bates, 2005). Moreover, the activation of Nrf2 stimulated Hsp70 production during oxidative-stress induced renal injury in rats (Rinaldi Tosi *et al.*, 2011).

### **Role of Nrf2 and ROS in heat shock (42°C)-induced apoptosis**

The induction of apoptosis by 42°C heat shock was dependent on levels of both Nrf2 and ROS. Apoptosis at 42°C in non-thermotolerant cells was diminished by the antioxidant PEG-catalase, as well as by Nrf2 stimulation using oltipraz. Nrf2 knockdown by shRNA sensitized cells to apoptosis at 42°C, as did inhibition of catalase using aminotriazole. Moreover, the protective effect of mild thermotolerance (40°C) against heat shock (42°C)-induced apoptosis appeared to be dependent on cellular ROS levels. The protective anti-apoptotic effect of mild thermotolerance was completely reversed by addition of the antioxidant PEG-SOD and the NOS inhibitor L-NAME. PEG-SOD would prevent the production of superoxide which is converted to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, whereas L-NAME would prevent production of nitric oxide at 40°C. This suggests that these reactive species were required for the development of mild thermotolerance at 40°C. However the protective, anti-apoptotic ability of thermotolerant cells was abrogated when catalase was inhibited by aminotriazole. The ensuing high levels of ROS would likely cause p53-mediated inhibition of Nrf2 that would prevent the acquisition of mild thermotolerance. Together, these results suggest that low dose, rather than high dose ROS generation is instrumental in the onset of the adaptive survival response of mild thermotolerance (40°C).

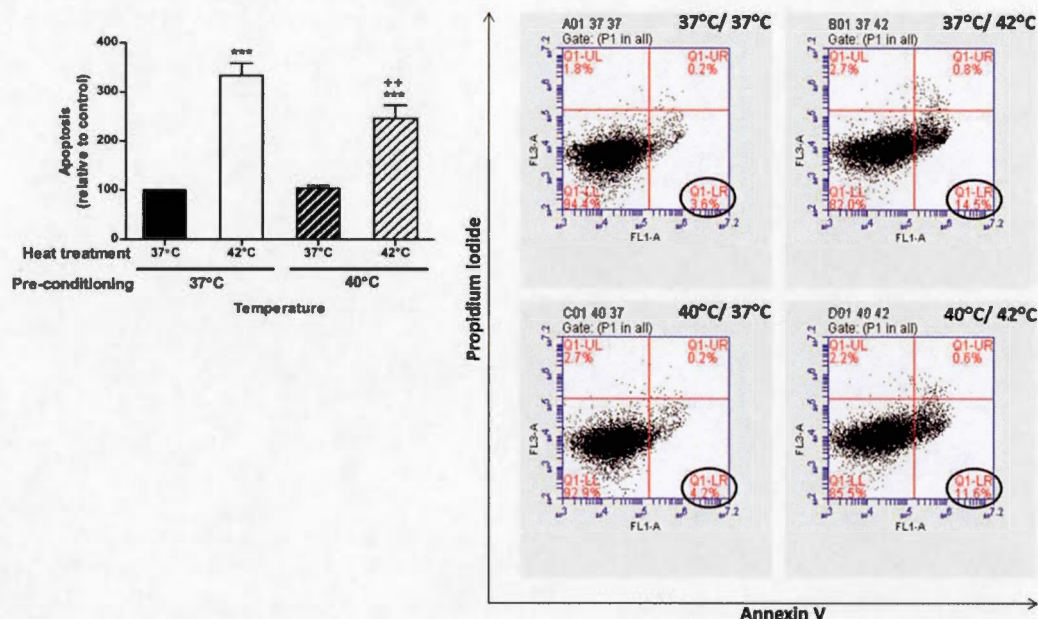
## Conclusion

This study shows that the protective effect of mild thermotolerance (40°C) against heat shock (42°C)-induced apoptosis relies partly on activation of the Nrf2 antioxidant pathway. The fact that activation of Nrf2 can be linked not only to oxidative stress, but also to p53, concurs with the idea that mild thermotolerance (40°C) is a potent inducer of multiple cellular protective mechanisms. This study helps to improve understanding of the activation of cellular defenses by mild thermotolerance (40°C), and eventually this knowledge could be useful to overcome stress-related ailments such as neurodegenerative diseases, arthritis and ischemia-reperfusion injury (Cominacini *et al.*, 2015 ; O'Connell et Hayes, 2015), as well as protecting against toxicity of environmental toxins. Nrf2 has already emerged as a promising target for the treatment of neurodegenerative diseases (Gan et Johnson, 2014 ; Johnson et Johnson, 2015).

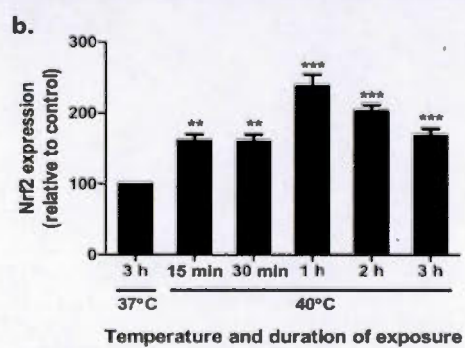
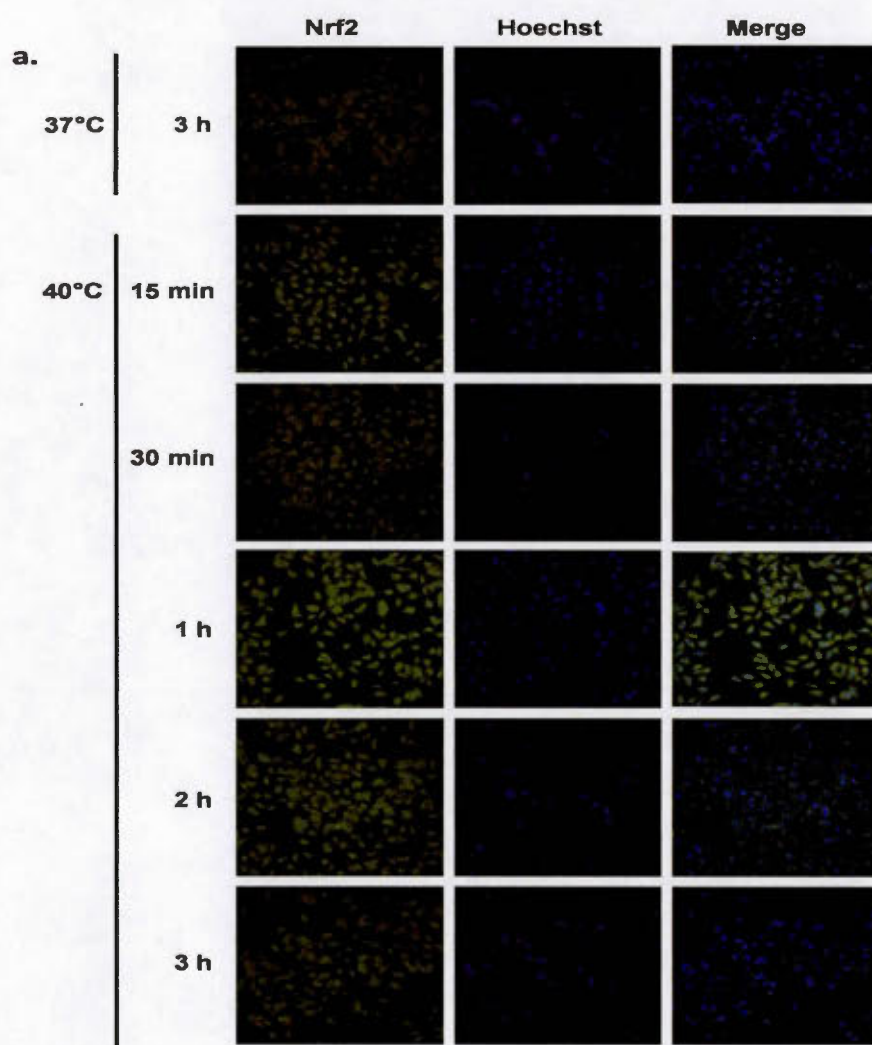
## Abbreviations

ARE: Antioxidant response element; ATF-3: Activating transcription factor-3; BSA: Bovine serum albumin; DAF: Diaminofluorescein; DHE: Dihydroethidium; D-MEM: Dulbecco's modification of Eagle's medium; DTT: Dithiothreitol; EDTA: Ethylene diamine tetraacetic acid; EGTA: Ethylene glycol tetraacetic acid; ER: Endoplasmic reticulum; FITC: Fluorescein isothiocyanate; GCL: Glutamate cysteine ligase; GPx1: Glutathione peroxidase 1; GSH: reduced glutathione; GSR: Glutathione S-reductase; GST: Glutathione S-transferase; G6PD: glucose-6-phosphatedehydrogenase; HeLa: Human cervical carcinoma cells; HO-1: Heme oxygenase-1; HRP: Horseradish peroxidase; Hsf1: Heat shock factor 1; Hsp: Heat shock protein; Keap1: Kelch ECH associating protein 1; L-NAME: L-N<sup>G</sup>-nitroarginine methyl ester; NOS: nitric oxide synthase; MDM2: Mouse double minute 2; MnSOD: Manganese superoxide dismutase; MOPS: 3-(N-morpholino)-propane sulfonic acid; NQO1: NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1; Nrf2: Nuclear factor erythroid 2-related factor 2; PBS: Phosphate-buffered saline; PC: PEG-catalase; PGD: 6-phosphogluconate dehydrogenase; PEG: Polyethylene glycol; PI: Propidium iodide; PKC: Protein kinase C; PMSF: Phenylmethylsulfonyl fluoride; Prx: Peroxiredoxin; ROS: Reactive oxygen species; SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; SEM: Standard error of mean; shRNA: short hairpin ribonucleic acid; SOD: superoxide dismutase; Trx: Thioredoxin; TrxR: Thioredoxin reductase.

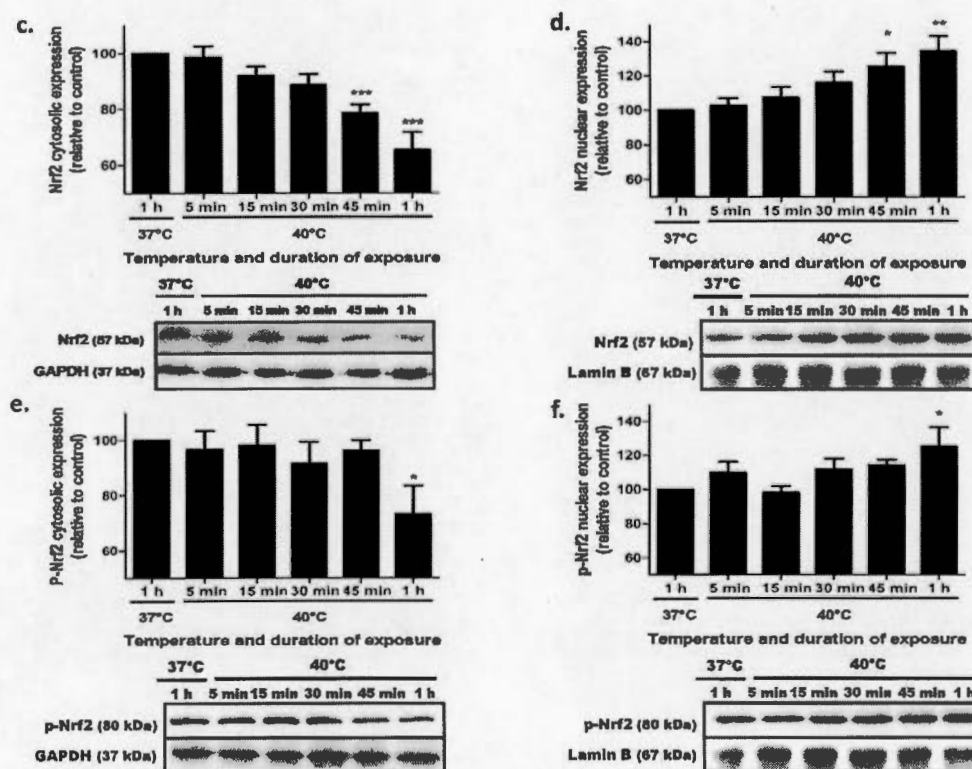
## 3.2.6 Figures



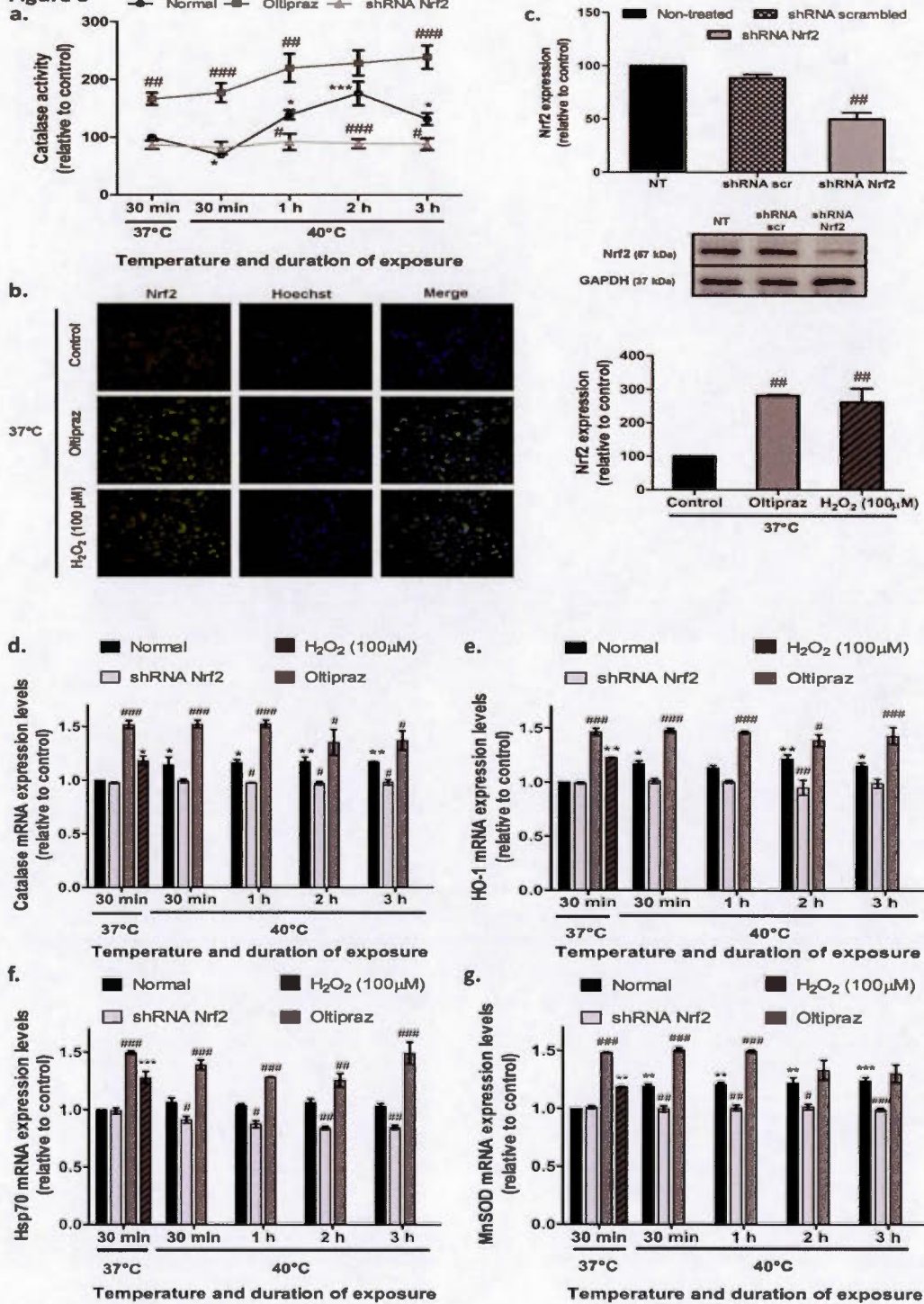
**Figure 3.1 Mild thermotolerance (40°C) protects cells against heat shock (42°C)-induced apoptosis.** Levels of apoptosis were determined by flow cytometry using Annexin V in cells heated at 37°C or 42°C following preconditioning for 3 h at 37°C (control, 100%) or 40°C (thermotolerant). Representative FACSscan blots are from at least three independent experiments. Means  $\pm$  SEM are from at least three independent experiments. For significant differences between heat shock (42°C)-treated cells and the control (37/37°C),  $p < 0.001$  (\*\*\*). For significant differences between non-thermotolerant (37°C) and thermotolerant (40°C) cells,  $p < 0.01$  (++) .

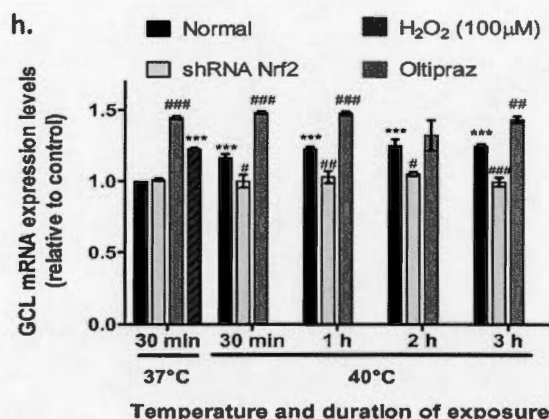






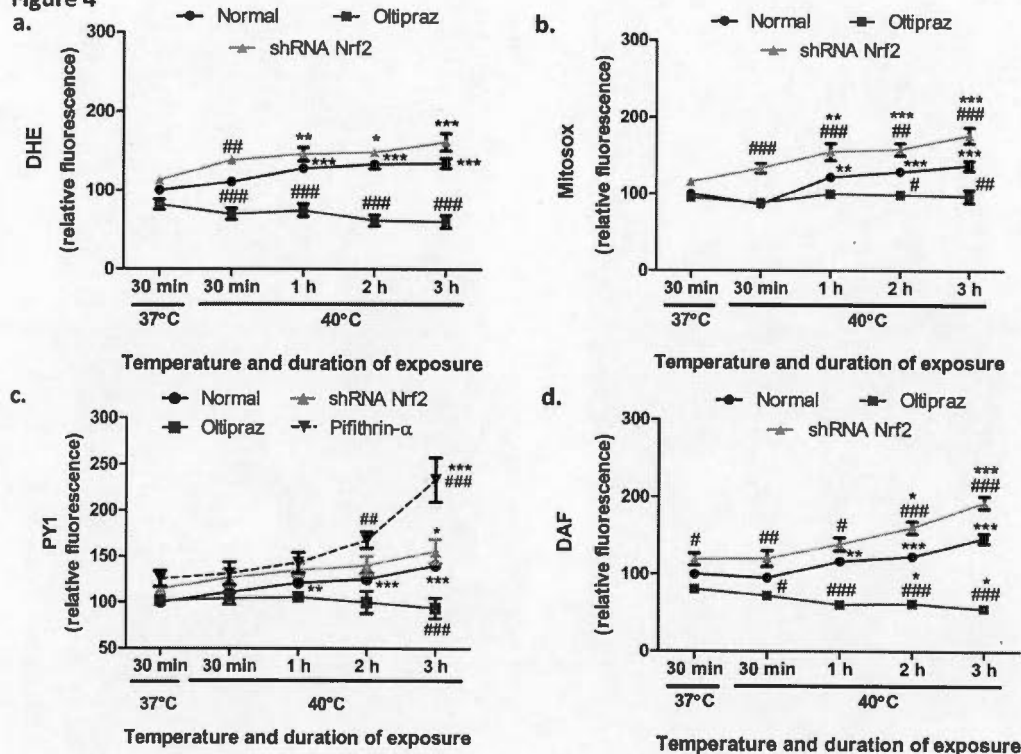
**Figure 3.2** Preconditioning of cells at 40°C increases expression of Nrf2. **3.2a.** Nrf2 levels (green, left panels) in cells incubated at 37°C for 3 h (control, 100 %) or 40°C for 15 min, 30 min, 1 h, 2 h or 3 h. Nuclei were stained using Hoechst 33258 (blue, center panels). Merge for Nrf2 and Hoechst fluorescence (right panels). Nrf2 fluorescence did not change between 15 min and 3 h at 37°C (not shown). **3.2b.** Quantification of Nrf2 expression (green fluorescence) in **3.2a** (left panels). Expression of Nrf2 detected by Western blotting in **(3.2c)** the cytosol relative to GAPDH, and in **(3.2d)** the nucleus relative to Lamin B. Expression of phospho-Nrf2 in **(3.2e)** the cytosol and **(3.2f)** nucleus. **3.2a.** Images and **(3.2c-f)** blots are representative of at least three independent experiments. Means  $\pm$  SEM are from at least three independent experiments. For significant differences between preconditioned cells (40°C) and the non-thermotolerant control (37°C),  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*)

**Figure 3**



**Figure 3.3: Levels of Nrf2 targets increase during preconditioning of cells at 40°C. 3.3a.** Catalase activity in cells incubated at 37°C for 30 min (control, 100 %) or 40°C for 30 min, 1 h, 2 h or 3 h. (Normal, —●—), or treated with oltipraz (—■—) or shRNA targeted against Nrf2 (—▲—). Catalase activity did not change between 30 min and 3 h at 37°C (not shown). **3.3b.** Nrf2 expression, detected by Western blotting (relative to GAPDH), in cells treated with scrambled (scr) shRNA or shRNA targeting Nrf2, relative to non-treated (NT) control (100 %). **3.3c.** Nrf2 activation by oltipraz or 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (positive control) was confirmed via immunofluorescence using Alexa 488-labeled Nrf2 antibody (green, left panels). Nuclei were stained using Hoechst 33258 (blue, center panels). Merge of Nrf2 and Hoechst fluorescence (right panels). Nrf2 expression (green fluorescence) is quantitated on the graph. qPCR analysis of (3.3d) catalase, (3.3e) HO-1, (3.3f) Hsp70, (3.3g) MnSOD and (3.3h) GCL. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 μM) was used as a positive control. Means ± SEM are from at least three independent experiments. For significant differences between heated cells (40°C) and control (37°C), p<0.05 (\*), p<0.01 (\*\*), p<0.001 (\*\*\*). For significant differences between treated (oltipraz, shRNA) and non-treated cells (Normal), for each condition, p<0.05 (#), p<0.01 (##), p<0.001 (###).

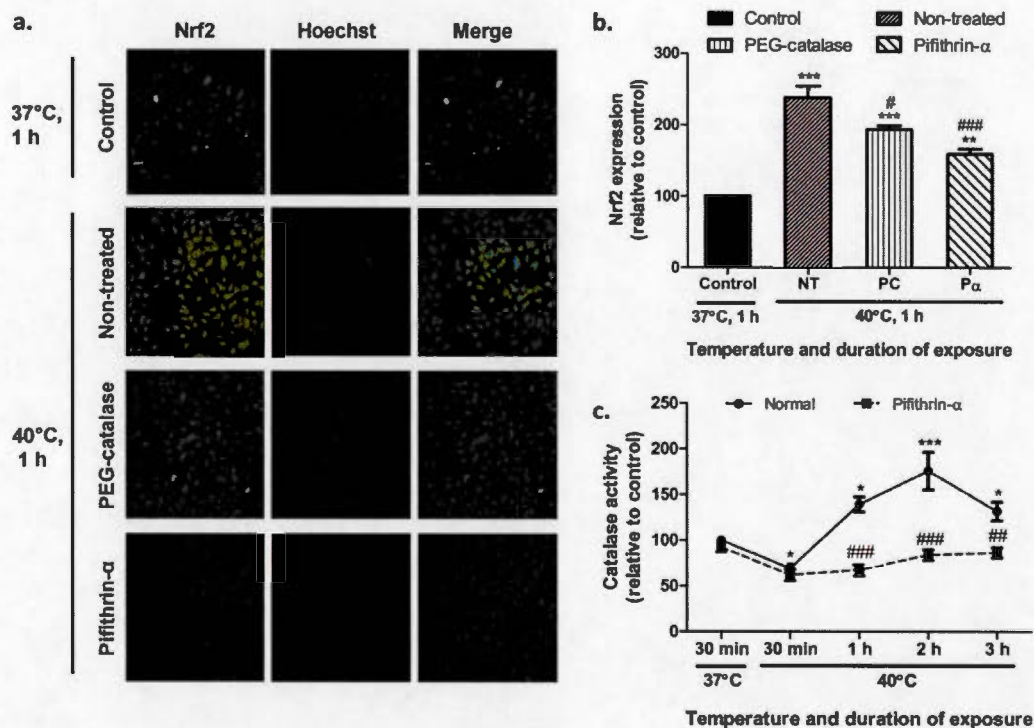
Figure 4



**Figure 3.4 Mild heat stress (40°C) increases ROS levels in HeLa cells: modulation by altered expression of Nrf2.** Cells were incubated at 37°C for 30 min (control, 100 %) or 40°C for 30 min, 1 h, 2 h or 3 h. Levels of (3.4a) DHE, (3.4b) MitoSox, (3.4c) Peroxy yellow or (3.4d) DAF fluorescence in cells treated with oltipraz (—■—), shRNA targeting Nrf2 (—▲—) or (3.4c only) pifithrin-α (—▼—), compared to untreated cells (Normal, —●—). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (25μM, 15min) was used as a positive control. Means ± SEM are from at least three independent experiments. For significant differences between heated cells (40°C) and controls (37°C, 30 min), p<0.05 (\*), p<0.01 (\*\*), p<0.001 (\*\*\*). For significant differences between treated (oltipraz, shRNA, pifithrin-α) and untreated cells (Normal), for each condition, p<0.05 (#), p<0.01 (##), p<0.001 (###).

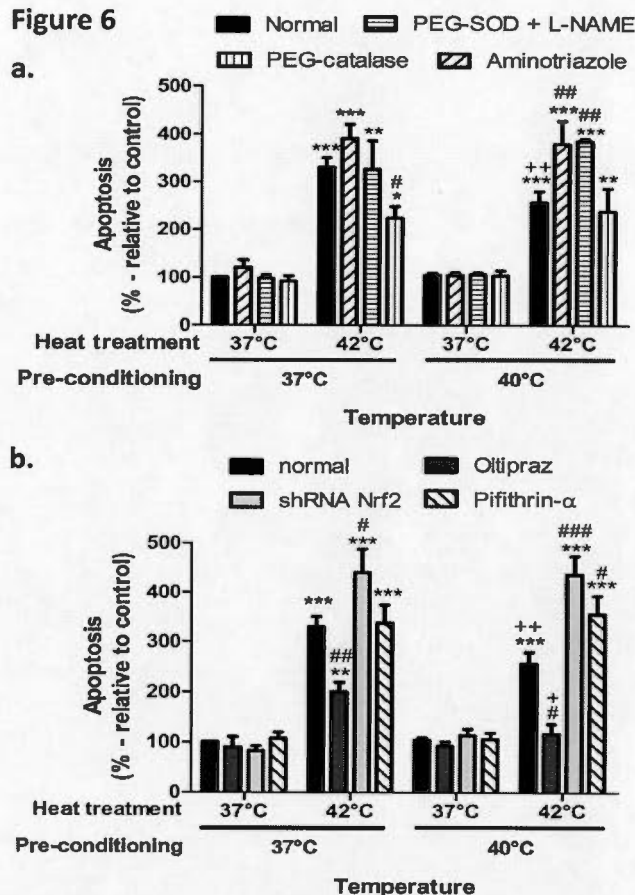


Figure 5



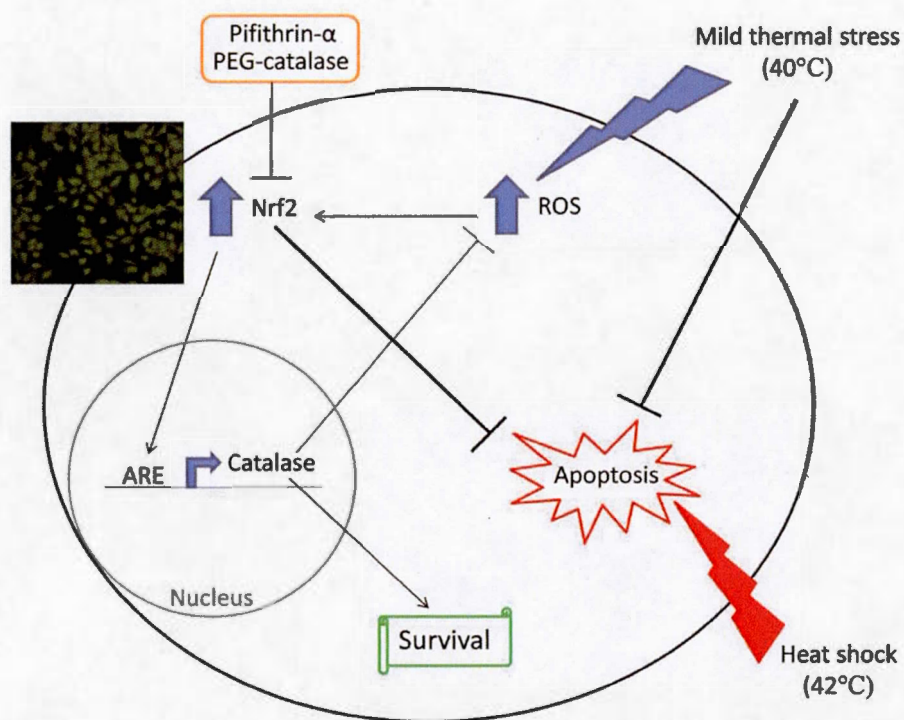
**Figure 3.5 Induction of Nrf2 expression after 1 h at 40°C is dependent on ROS and p53.** 3.5a. Cellular levels of Nrf2 (green fluorescence) in cells incubated at 37°C (control; 100%) or 40°C for 1 h. Cells at 40°C were either non-treated (NT) or treated with PEG-catalase or pifithrin- $\alpha$ . Nuclei were stained using Hoechst 33258 (blue fluorescence). The merge of Nrf2 and Hoechst fluorescence is shown in the right panels. 3.5b. Green fluorescence corresponding to Nrf2 expression is quantitated on the graph. 3.5c. Catalase activity in cells incubated at 37°C for 30 min (control, 100 %) or 40°C for 30 min, 1 h, 2 h or 3 h. Cells were treated with pifithrin- $\alpha$  (—▼—) or sodium pyruvate (—▲—), compared to non-treated cells (Normal, —●—). Means  $\pm$  SEM are from at least three independent experiments. For significant differences between preconditioned cells (40°C) and the non-thermotolerant control (37°C),  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*). For significant differences between treated and untreated cells (Normal), for each condition,  $p < 0.05$  (#),  $p < 0.01$  (##),  $p < 0.001$  (###).



**Figure 6**

**Figure 3.6 Nrf2 is partially responsible for the protective effect of mild thermotolerance (40°C).** Levels of apoptosis (AnnexinV) following heat shock (3 h at 42°C) in thermotolerant (3 h at 40°C) and non-thermotolerant (3 h at 37°C) cells.

**3.6a.** Cells were treated with PEG-catalase (▤), PEG-SOD and L-NAME (▥) or aminotriazole (▧), compared to non-treated cells (Normal, ■). **3.6b.** Cells were treated with oltpiraz (▦), shRNA targeting Nrf2 (▨) or pifithrin-α (▩), compared to non-treated cells (Normal, ■). Means ± SEM are from at least three independent experiments. For significant differences between 42°C-treated cells and control (37/37°C),  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*). For significant differences between treated (antioxidants, aminotriazole, oltpiraz, shRNA, Pα) and non-treated cells (Normal) for each condition,  $p < 0.05$  (#),  $p < 0.01$  (##),  $p < 0.001$  (###). For significant differences between non-thermotolerant (37°C) and thermotolerant (40°C) cells,  $p < 0.05$  (+),  $p < 0.01$  (++).



**Scheme 3.1 The role of ROS and Nrf2 in the onset of mild thermotolerance at 40°C.** The protective effect of mild heat preconditioning at 40°C against heat shock (42°C)-induced apoptosis depends partly on its ability to increase cellular levels of ROS in order to activate the Nrf2 antioxidant pathway. The induction of Nrf2 expression during onset of mild thermotolerance was inhibited by the antioxidant PEG-catalase, indicating that this is a ROS-dependent process. Pifithrin- $\alpha$  inhibited the thermotolerance-induced increase in Nrf2 expression, indicating its dependence on the tumor suppressor p53.

## CHAPITRE IV

### DISCUSSION

Le cancer, étant l'une des premières causes de mortalité au monde (McGuire, 2016 ; Organisation mondiale de la santé, 2015), nécessite la mise en place de thérapies efficaces. À ce jour, de nombreux types de thérapie existent, avec en premier lieu la chimiothérapie et la radiothérapie. Ces traitements voient leur efficacité améliorée par de nombreuses avancées, notamment au niveau de la découverte de nouveaux agents chimiothérapeutiques (Société Canadienne du Cancer, 2015). Cependant, l'avenir des thérapies anticancéreuses passera surtout par la mise en place de thérapies mixtes, afin de mieux cibler la tumeur et d'adapter le remède au patient. L'hyperthermie répond à tous ces critères : elle peut par exemple être utilisée en combinaison avec la chimiothérapie, la radiothérapie (Horsman et Overgaard, 2007 ; Issels, 2008 ; van der Zee, 2002 ; van der Zee *et al.*, 2008) et l'immunothérapie (Jolesch *et al.*, 2012), afin d'augmenter leur cytotoxicité et abaisser la dose nécessaire, donc diminuer les effets secondaires. Les différents modes d'application de l'hyperthermie en font également une technique très versatile et qui peut cibler précisément la tumeur afin de concentrer son effet cytotoxique sur les cellules cancéreuses ou guider les composés anti-tumoraux jusqu'à la tumeur (Bates et Mackillop, 1986). Il est donc primordial de poursuivre les recherches fondamentales sur l'hyperthermie pour mieux comprendre ses mécanismes sous-jacents afin de permettre son utilisation optimale.

### **Impact de l'hyperthermie (42-43°C, 3 h) sur l'expression des protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2.**

Il a déjà été prouvé que l'hyperthermie (42-45°C) mène à l'activation dans les cellules de nombreuses voies pouvant mener à la mort, notamment les voies apoptotiques des récepteurs de mort (Bettaieb et Averill-Bates, 2008) et du RE (Bettaieb et Averill-Bates, 2015). Dans l'article "Mild thermotolerance induced at 40°C protects cells against hyperthermia-induced pro-apoptotic changes in Bcl-2 family proteins", nous avons prouvé que l'hyperthermie (42-43°C) permet également d'activer la voie mitochondriale de l'apoptose, et ce grâce à la modulation des protéines de la famille Bcl-2. Pour ce faire, l'expression subcellulaire de différents membres pro-apoptotiques et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 a été mesurée par Western Blot chez des cellules HeLa. L'application de températures hyperthermiques provoque une perturbation de l'équilibre cellulaire et mitochondrial au sein de la famille Bcl-2, en faveur de ses membres pro-apoptotiques. En effet, l'expression totale des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL est diminuée dans les cellules exposées à un choc thermique (42-43°C). En revanche, l'expression des protéines pro-apoptotiques Bax, Bak, Puma et Noxa est augmentée dans la mitochondrie en réponse à l'hyperthermie. Cette augmentation va mener à l'activation de la caspase-9, spécifique de la voie apoptotique mitochondriale, ainsi qu'à l'activation de la caspase-3, caspase terminale de l'apoptose. Enfin, la condensation de la chromatine, marqueur physique de l'entrée en apoptose des cellules, est augmentée à la suite de l'exposition des cellules à des températures de 42-43°C. Cette modulation des membres de la famille Bcl-2 pourrait en partie expliquer l'effet cytotoxique de l'hyperthermie ainsi que son effet sensibilisant envers les traitements de radio- et chimiothérapie (Horsman et Overgaard, 2007 ; Issels, 2008 ; van der Zee, 2002 ; van der Zee *et al.*, 2008).

Plusieurs études ont en effet montré que des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 peuvent être activées par les chocs thermiques. Les protéines Bax et Bak, en particulier, sont souvent surexprimées en réponse à l'hyperthermie (Pagliari *et al.*, 2005). Notre étude montre que les protéines "BH3-only" Puma et Noxa sont également surexprimées. Puma est capable de lier, et donc d'inhiber l'activité de toutes les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 alors que Noxa est un antagoniste spécifique des protéines anti-apoptotiques Mcl-1 et A1 (Tonino *et al.*, 2011). L'expression de ces deux protéines a la particularité de pouvoir être induite par p53 (Valente *et al.*, 2013), ce que nous avons pu confirmer en utilisant la pifithrin- $\alpha$ . P $\alpha$  est un inhibiteur de l'activité de p53 dans le noyau, diminuant ainsi la transactivation par p53 de ces gènes cibles (Komarov *et al.*, 1999). Nous avons pu montrer que l'augmentation de l'expression de Noxa et Puma par l'hyperthermie (42-43°C) est inhibée dans les cellules traitées avec la P $\alpha$ . Le traitement des cellules avec la PEG-catalase permet également d'annuler les effets de l'hyperthermie sur l'expression de Noxa et Puma, ce qui indique donc que les ERO joueraient un rôle important dans leur activation. En effet, en plus d'être surexprimé en réponse aux ERO, Noxa semble agir comme médiateur entre les ERO et l'induction de l'apoptose par ces derniers (Tonino *et al.*, 2011). Puma peut également voir son expression augmentée par les ERO, et ce possiblement via p53 (Yu et Zhang, 2008). L'ajout de la PEG-catalase dans les cellules a également permis de renverser la diminution de l'expression de Bcl-2 causée par l'hyperthermie. Effectivement, les ERO sont connues pour mener à la dégradation de Bcl-2 par le protéasome (Azad *et al.*, 2010). La production d'ERO par l'hyperthermie permet donc d'activer les réponses pro-apoptotiques de la cellule (Azad *et al.*, 2010).

La surexpression des membres anti-apoptotiques de la famille de protéines Bcl-2 est commune à de nombreux types de cancer. Elle est corrélée avec une résistance accrue aux traitements de chimio- et radiothérapie (Frenzel *et al.*, 2009). En effet, ces traitements visant le plus souvent à provoquer l'apoptose des cellules



cancéreuses, une surexpression des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1) peut mener à la survie des cellules malgré le traitement (Frenzel *et al.*, 2009). De cette façon, la surexpression de Bcl-2 et Bcl-xL dans des lignée murines hématopoïétiques a mené à l'inhibition de l'apoptose induite par les chocs thermiques (42°C, 1h ou 44°C, 40 min) (Hildebrandt *et al.*, 2002 ; Holohan *et al.*, 2013), de même que la surexpression de Bcl-2/Bcl-xL dans la lignée humaine Jurkat (44°C, 1 h) (Pagliari *et al.*, 2005). Dans le cadre de la lutte contre les cellules cancéreuses, le but est donc d'inhiber les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 pour permettre aux différents traitements cytotoxiques d'effectuer leur tâche. Nous venons de voir que l'hyperthermie est capable d'inhiber ces protéines, ce qui en fait donc un traitement additif de choix. Une autre solution réside dans l'utilisation d'inhibiteur des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. La molécule ABT-737 possède des domaines BH lui permettant de se lier à Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-w (Andreu-Fernandez *et al.*, 2013 ; Oltersdorf *et al.*, 2005 ; Rooswinkel *et al.*, 2012). En se liant à ces protéines, l'ABT-737 empêche leur liaison avec les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak, ces derniers pouvant alors migrer à la mitochondrie pour enclencher la voie mitochondriale de l'apoptose, passant notamment par l'activation des caspases-9 et -3. Dans notre étude, nous avons prouvé que l'ABT-737 est capable d'augmenter l'activité de ces deux caspases, chez des cellules normales (37°C) comme chez des cellules ayant subi un choc thermique (42-43°C). L'ABT-737 permettant de sensibiliser les cellules à l'activité cytotoxique de l'hyperthermie, cela suggère que leur utilisation en combinaison pourrait permettre une augmentation importante de l'apoptose chez les cellules cancéreuses. L'ABT-263 est l'analogue de l'ABT-737 utilisé à ce jour en études cliniques, notamment contre les leucémies lymphoïdes chroniques (Gandhi *et al.*, 2011 ; Vela et Marzo, 2015 ; Vogler *et al.*, 2010 ; Wilson *et al.*, 2010).

L'hyperthermie est donc capable d'activer la voie d'apoptose mitochondriale en modulant l'expression des protéines anti- et pro-apoptotiques de la famille Bcl-2.

Dans les cellules HeLa, l'hyperthermie est donc capable d'activer les trois voies principales d'induction de l'apoptose, par les mitochondries, les récepteurs de mort et le RE.

Alors que l'exposition à de hautes températures ( $>42^{\circ}\text{C}$ ) permet de tuer les cellules cancéreuses en activant les diverses voies apoptotiques (van der Zee, 2002), le pré-conditionnement des cellules à des températures plus modérées induit la thermotolérance (Bettaieb et Averill-Bates, 2005 ; Landry *et al.*, 1982 ; Przybytkowski *et al.*, 1986 ; Singh et Hasday, 2013 ; Subjeck *et al.*, 1982). La thermotolérance se caractérise par l'exposition des cellules à un stress thermique modéré ( $39-41^{\circ}\text{C}$ ) qui va déclencher l'activation de nombreuses voies de survie. Les cellules peuvent alors survivre à l'application d'un stress plus intense, comme par exemple  $100\text{ }\mu\text{M}$  de peroxyde d'hydrogène (Pallepati et Averill-Bates, 2010, 2011a, 2011b) ou des chocs thermiques à  $42^{\circ}\text{C}$  ou  $43^{\circ}\text{C}$  (Bettaieb et Averill-Bates, 2005, 2008, 2015). Parmi les mécanismes de survie activés par la thermotolérance, on trouve la réponse UPR (Bettaieb et Averill-Bates, 2015 ; Pallepati et Averill-Bates, 2011a), les protéines de choc thermique (Bettaieb et Averill-Bates, 2005, 2008) et les antioxydants (Pallepati et Averill-Bates, 2010). Ce conditionnement des cellules par l'utilisation d'un stress modéré a également été observé suite à des périodes courtes d'ischémie/reperfusion afin de lutter contre les effets adverses que pourraient avoir de plus longues périodes (Portt *et al.*, 2011). De faibles doses de peroxyde d'hydrogène ont aussi été utilisées afin de conditionner les cellules avant d'effectuer une déplétion en sérum : le stress de conditionnement et le stress subséquent n'ont donc pas besoin d'être les mêmes (Portt *et al.*, 2011). De plus, il a été prouvé qu'un post-conditionnement pouvait s'avérer efficace dans le cas d'une ischémie/reperfusion (Portt *et al.*, 2011).

### **Impact de la thermotolérance (40°C, 3 h) sur l'expression des protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2.**

Nous avons vu que l'hyperthermie (42-43°C), chez des cellules "normales" (c'est-à-dire non-thermotolérantes), module l'expression des protéines de la famille Bcl-2 en faveur de ses membres pro-apoptotiques. Le pré-conditionnement des cellules pendant 3 h à 40°C avant de leur faire subir les chocs thermiques de 42-43°C permet d'atténuer leurs effets. Ainsi, la thermotolérance permet de diminuer l'augmentation de l'expression des protéines Bax, Bak, Puma et Noxa provoquée par l'hyperthermie. De même, la thermotolérance permet de rétablir les niveaux de Bcl-2 et Bcl-xL, empêchant leur diminution par l'hyperthermie. Cette modulation des protéines de la famille Bcl-2 par la thermotolérance peut être due aux protéines de choc thermique, les Hsp27, 32, 60, 72, 90 et 110 étant surexprimées chez les cellules thermotolérantes (Bettaieb et Averill-Bates, 2005, 2008). La famille des Hsp70 regroupe différentes isoformes qui se distinguent par leur poids moléculaire et leur localisation subcellulaire: la forme constitutive (Hsc70; 73 kDa), la forme mitochondriale (Hsp75, 75 kDa), la forme du réticulum endoplasmique (GRP78, 78 kDa) et la forme induite par le stress (Hsp70 ou Hsp72, 72 kDa) (Kaur *et al.*, 2010). Parmi les Hsp, Hsp70 est celle qui est induite le plus fortement par la chaleur (Gupta *et al.*, 2013). Elle peut intervenir à différents endroits de la voie mitochondriale afin d'éviter l'apoptose. Par exemple, Hsp70 peut inhiber JNK afin d'empêcher la troncation de Bid en tBid et donc le recrutement de Bax et Bak, et la MOMP (Stankiewicz *et al.*, 2005). En aval de la mitochondrie, Hsp70 et Hsp90 peuvent inhiber Apaf1, évitant ainsi la formation de l'apoptosome et l'activation des caspases. Hsp27 peut quant à elle se lier au cytochrome c pour également éviter la formation de l'apoptosome ou directement inhiber la caspase-3. Hsp60 pourrait se lier à Bax et Bak afin d'empêcher leur translocation à la mitochondrie (Stankiewicz *et al.*, 2005). Au niveau du RE, Hsp27 peut être activée par Bcl-2 afin d'exercer son action anti-apoptotique (Chandrika *et al.*, 2010). En plus d'inhiber différents processus pro-

apoptotiques, Hsp70 peut augmenter l'expression de Mcl-1 en plus d'inhiber sa dégradation (Stankiewicz *et al.*, 2009). Les Hsp peuvent donc diminuer l'activation de Bax et Bak, maintenir l'intégrité de la mitochondrie et permettre la surexpression de protéines anti-apoptotiques. Bcl2l12 est une protéine récemment identifiée comme faisant partie de la famille Bcl-2 et dont l'expression est associée à un pronostic de survie chez les patients atteints de cancer du sein. Hsp70 interagit avec Bcl2l12 pour empêcher sa dégradation (Yang *et al.*, 2009).

**La thermotolérance (40°C) entraîne la production d'ERO dans les cellules de façon précoce, ce qui permet l'activation de la voie antioxydante impliquant Nrf2.**

Nrf2 est un facteur de transcription pouvant être activé par différents types de stress, comme le stress oxydatif (O'Connell et Hayes, 2015) ou l'exposition à des xénobiotiques (Geismann *et al.*, 2014). Sa translocation au noyau permet d'initier la transcription de nombreux gènes codants pour des antioxydants tels que les enzymes GCL (Fan *et al.*, 2014), SOD (Carmona-Aparicio *et al.*, 2015) et catalase (Girnun *et al.*, 2002 ; Glorieux *et al.*, 2015). Il a été démontré que l'expression de ces trois enzymes est induite par la thermotolérance (40°C, 3 h) (Pallepati et Averill-Bates, 2010). L'exposition des cellules à un stress thermique modéré (40°C) permet rapidement (30-60 min) d'observer une accumulation d'espèces oxydantes (Chapitre III). Cette accumulation entraîne une augmentation de l'expression du facteur de transcription Nrf2, qui pourra alors induire la transcription des gènes codants pour divers antioxydants, dont la catalase. L'activité de celle-ci est augmentée après 1 h d'exposition des cellules à 40°C. Cette cascade constitue donc un événement précoce parmi les mécanismes de défense mis en place par la thermotolérance (40°C).

p53 peut inhiber ou activer la voie antioxydante impliquant Nrf2. En présence d'un fort taux d'ERO dans la cellule, p53 sera activé et induira l'inhibition de la transcription des gènes cibles de Nrf2, en plus de promouvoir l'arrêt du cycle cellulaire et l'entrée de la cellule en apoptose (Chen *et al.*, 2012 ; Fan *et al.*, 2014). En revanche, une basse concentration en ERO va permettre le maintien d'un niveau d'expression de p53 modéré. p53 induira alors l'activation de Nrf2 et l'expression de ces gènes cibles (Chen *et al.*, 2012 ; Fan *et al.*, 2014). L'utilisation de l'inhibiteur de p53 pifithrin- $\alpha$  nous a permis d'étudier le lien entre ces deux protéines dans le cadre de la thermotolérance (40°C). Nos résultats montrent que dans ces conditions, l'inhibition de p53 mène à une diminution de l'expression de Nrf2. Cela implique que le niveau d'augmentation des ERO par la thermotolérance reste suffisamment bas pour que la cellule enclenche des mécanismes de survie via l'activation de Nrf2 par p53 plutôt que d'utiliser l'activité pro-apoptotique de cette dernière.

Il existe plusieurs liens entre le stress oxydatif et la thermotolérance, notamment par l'augmentation de l'expression des Hsp27, 32, 60, 70, 90 et 110 par la thermotolérance (40°C) (Bettaieb et Averill-Bates, 2005). La première fonction des Hsp étant leur fonction de chaperonne, elles peuvent être activées par les dommages aux protéines (modifications de résidus cystéine, agrégation, etc.) causés par les ERO (Niforou *et al.*, 2014). De plus, le promoteur du gène codant pour Hsp70 contient un ARE, ce qui en fait une cible de Nrf2 (No *et al.*, 2014). L'activation des Hsp par Nrf2 est d'autant plus plausible que le pic d'activation de Nrf2 apparaît après 1 h à 40°C alors que l'induction des Hsp ne débute qu'à partir de 2 h d'exposition à cette température (Bettaieb et Averill-Bates, 2005, 2008). Il serait donc intéressant d'étudier l'expression des Hsp à 40°C dans la lignée HeLa rendue déficiente en Nrf2 par un shRNA afin de confirmer cette théorie.

En plus des Hsp et des antioxydants, la thermotolérance peut activer le stress du réticulum endoplasmique (RE) et la réponse UPR, qui prennent place dans le RE



(Bettaieb et Averill-Bates, 2015). Lorsque des protéines non ou mal repliées s'accumulent dans le RE, la réponse UPR va tenter de rétablir l'homéostasie. Pour ce faire, l'UPR va inhiber la traduction de nouvelles protéines grâce à la voie PERK/eIF2 $\alpha$ , augmenter la production de chaperonnes grâce aux voies ATF4 et IRE1/XBP1 et augmenter la dégradation des protéines mal repliées par l'ERAD (Bettaieb et Averill-Bates, 2015 ; Cominacini *et al.*, 2015). Si le rétablissement de l'homéostasie n'est plus envisageable, la cellule activera la protéine CHOP et la caspase-4/12 qui mèneront à l'apoptose (Bettaieb et Averill-Bates, 2015 ; Cominacini *et al.*, 2015). La thermotolérance (40°C, 3 h) induit une augmentation de l'expression de PERK et eIF2 $\alpha$  et de leurs formes actives phosphorylées (Pallepati et Averill-Bates, 2011a), ainsi qu'une diminution de l'expression de la caspase-4 (Bettaieb et Averill-Bates, 2015). L'augmentation de l'expression de PERK peut être mise en lien avec l'activation de Nrf2. En effet, PERK peut phosphoryler Nrf2, provoquant ainsi sa dissociation d'avec Keap1 et sa translocation au noyau (Cullinan et Diehl, 2006). Une fois dans le noyau, Nrf2 pourra exercer son rôle de survie en activant la transcription de gènes liés au protéasome et à l'ERAD afin de faciliter l'élimination des protéines mal repliées (Cominacini *et al.*, 2015). Dans le cas du stress du RE, l'activation de Nrf2 semble être liée uniquement à sa phosphorylation par PERK et non à une éventuelle augmentation des ERO (Cullinan et Diehl, 2006). Il serait donc intéressant d'étudier l'activation de Nrf2 en absence de PERK (par shRNA par exemple) ainsi que l'impact d'une inhibition de Nrf2 par shRNA sur l'expression de PERK.

Il pourrait également y avoir un lien entre la voie antioxydante Nrf2 et l'autophagie. Lorsqu'une cellule est exposée à un stress faible elle peut faire appel à l'autophagie pour survivre. Il est possible que cette activation de l'autophagie soit liée à l'activation de Nrf2 que nous avons prouvée. En effet, il est connu que l'autophagie peut être induite en réponse à des ERO (Fulda et Kogel, 2015). La protéine p62, un initiateur de l'autophagie, est d'ailleurs exprimé en réponse aux ERO à travers la voie

Nrf2 (Fulda et Kogel, 2015). Il serait donc intéressant d'étudier l'activation de l'autophagie en réponse aux ERO dans une lignée shRNA pour Nrf2 afin de vérifier si la voie Nrf2 contribue au déclenchement de l'autophagie.

**Les protéines Bcl-2 et Nrf2 sont impliquées dans la protection par la thermotolérance (40°C) des cellules contre l'apoptose induite par les stress thermiques forts (42-43°C).**

Nous avons montré dans le Chapitre II que la thermotolérance est capable de moduler l'expression des protéines de la famille Bcl-2. En utilisant l'ABT-737, un inhibiteur des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL, nous avons pu montrer que ces protéines sont en partie responsables de l'effet protecteur de la thermotolérance (40°C). En effet, l'utilisation de l'ABT-737 mène à la diminution de la protection fournie par la thermotolérance contre l'apoptose induite par les chocs thermiques (42-43°C).

Dans le Chapitre III, nous avons montré que le conditionnement des cellules à 40°C permet l'activation du facteur de transcription Nrf2. L'inhibition de l'expression de Nrf2 par shRNA mène à la diminution de l'effet protecteur de la thermotolérance contre l'apoptose induite par les chocs thermiques (42°C) tandis que la suractivation de Nrf2 par l'oltipraz augmente cette protection. L'activation de Nrf2 et des antioxydants qu'il régule est donc en partie responsable de l'effet protecteur de la thermotolérance induite à 40°C.

Il a récemment été prouvé que Nrf2 interagit avec Bcl-2 et Bcl-xL (Niture et Jaiswal, 2012, 2013). En effet, la présence d'ARE au niveau des promoteurs des gènes codants pour ces deux protéines a été prouvée, ainsi que l'interaction de Nrf2 avec ces séquences ARE. De plus, l'inhibition de Nrf2 mène à une diminution de l'expression de Bcl-2 et Bcl-xL alors que la surexpression de Nrf2 entraîne une

augmentation de l'expression de ces protéines. Cette augmentation a pour conséquence la diminution de marqueurs associés à l'apoptose tels l'expression de Bax et l'activité de la caspase-3 (Niture et Jaiswal, 2012, 2013). L'augmentation de l'expression de Nrf2 par la thermotolérance étant un facteur précoce (1 h à 40°C), il est possible que la modulation des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 exercée par la thermotolérance (3 h à 40°C) soit en lien avec Nrf2. Il serait intéressant d'étudier l'expression de Nrf2 en présence de l'ABT-737 ainsi que la cinétique de la modification de l'expression de Bcl-2 et Bcl-xL par la thermotolérance.

### **Conclusion**

Cette étude a permis d'approfondir nos connaissances sur (1) les mécanismes de mort cellulaire activés par les chocs thermiques (42-43°C) et (2) les molécules impliquées dans la mise en place de l'effet protecteur de la thermotolérance (40°C) contre l'apoptose induite par des chocs thermiques.

Comme mentionné dans cette discussion, notre étude soulève de nombreuses perspectives de recherche. Il serait en effet intéressant d'étudier les liens unissant Nrf2 à diverses protéines (p53, Hsp, PERK, Bcl-2) dans le cadre de l'induction de la thermotolérance (40°C). De même, Nrf2 étant capable d'activer la transcription du système antioxydant Prx/Trx (Gorrini *et al.*, 2013), leur interaction chez les cellules thermotolérantes pourrait être étudiée. Enfin, l'autophagie étant, comme le stress du RE, une réponse de survie qui peut basculer vers la mort de la cellule, il serait intéressant d'étudier l'induction possible de l'autophagie par la thermotolérance et d'explorer dans ce cadre le lien qui existe entre autophagie et Nrf2.

D'un point de vue clinique, les connaissances acquises sur l'hyperthermie et la thermotolérance dans cette étude vont permettre d'envisager l'optimisation du traitement du cancer par hyperthermie, par exemple en le combinant avec des inhibiteurs de Bcl-2. Quant à la thermotolérance, il est important de mieux

comprendre les multiples voies de survie qui y sont associées afin de poser les bases pour une éventuelle utilisation clinique. En effet, la thermotolérance est capable d'activer de nombreuses voies de survie dans les cellules, notamment via l'activation de Nrf2 et la production d'antioxydants. La thermotolérance pourrait donc être utilisée en clinique afin d'activer les défenses naturelles des cellules pour les aider à lutter contre le stress oxydatif. Nrf2 est d'ailleurs déjà une cible potentielle dans le traitement de maladies liées au stress oxydatif telles les maladies neurodégénératives (Gan et Johnson, 2014 ; Johnson et Johnson, 2015). La thermotolérance étant également capable d'activer des voies de survie liées à d'autres types de stress, comme par exemple le stress de RE, son utilisation clinique pourrait recouvrir l'ensemble des maladies liées à des stress cellulaires (Cominacini *et al.*, 2015 ; Espinosa-Diez *et al.*, 2015).

## RÉFÉRENCES

- Affram, K., Udofot, O., Cat, A. et Agyare, E. (2015). In vitro and in vivo antitumor activity of gemcitabine loaded thermosensitive liposomal nanoparticles and mild hyperthermia in pancreatic cancer. *Int J Adv Res (Indore)*, 3(10), 859-874.
- Ahmad, J., Akhter, S., Rizwanullah, M., Amin, S., Rahman, M., Ahmad, M.Z., Rizvi, M.A., Kamal, M.A. et Ahmad, F.J. (2015). Nanotechnology-based inhalation treatments for lung cancer: state of the art. *Nanotechnol Sci Appl*, 8, 55-66.
- Amaral, J.D., Xavier, J.M., Steer, C.J. et Rodrigues, C.M. (2010). The role of p53 in apoptosis. *Discov Med*, 9(45), 145-152.
- Andreu-Fernandez, V., Genoves, A., Messeguer, A., Orzaez, M., Sancho, M. et Perez-Paya, E. (2013). BH3-mimetics- and cisplatin-induced cell death proceeds through different pathways depending on the availability of death-related cellular components. *PLoS One*, 8(2), e56881.
- Arrigo, A.P. (2001). Hsp27: novel regulator of intracellular redox state. *IUBMB Life*, 52(6), 303-307.
- Arya, R., Mallik, M. et Lakhotia, S.C. (2007). Heat shock genes - integrating cell survival and death. *J Biosci*, 32(3), 595-610.
- Azad, N., Iyer, A., Vallyathan, V., Wang, L., Castranova, V., Stehlik, C. et Rojanasakul, Y. (2010). Role of oxidative/nitrosative stress-mediated Bcl-2 regulation in apoptosis and malignant transformation. *Ann N Y Acad Sci*, 1203, 1-6.
- Baronzio, G., Gramaglia, A. et Fiorentini, G. (2009). Review. Current role and future perspectives of hyperthermia for prostate cancer treatment. *In Vivo*, 23(1), 143-146.
- Bates, D.A. et Mackillop, W.J. (1986). Hyperthermia, adriamycin transport, and cytotoxicity in drug-sensitive and -resistant Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res*, 46(11), 5477-5481.
- Bedard, K. et Krause, K.H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 87(1), 245-313.
- Beere, H.M. (2005). Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *J Clin Invest*, 115(10), 2633-2639.
- Belizario, J., Vieira-Cordeiro, L. et Enns, S. (2015). Necroptotic Cell Death Signaling and Execution Pathway: Lessons from Knockout Mice. *Mediators Inflamm*, 2015, 128076.
- Bergsbaken, T., Fink, S.L. et Cookson, B.T. (2009). Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol*, 7(2), 99-109.



- Bettaieb et Averill-Bates. (2005). Thermotolerance induced at a mild temperature of 40 degrees C protects cells against heat shock-induced apoptosis. *J Cell Physiol*, 205(1), 47-57.
- Bettaieb et Averill-Bates. (2008). Thermotolerance induced at a fever temperature of 40 degrees C protects cells against hyperthermia-induced apoptosis mediated by death receptor signalling. *Biochem Cell Biol*, 86(6), 521-538.
- Bettaieb et Averill-Bates. (2015). Thermotolerance induced at a mild temperature of 40 degrees C alleviates heat shock-induced ER stress and apoptosis in HeLa cells. *Biochim Biophys Acta*, 1853(1), 52-62.
- Bettaieb, Wrzal et Averill-Bates. (2013). Hyperthermia: Cancer Treatment and Beyond. Dans Rangel, P. L. (dir.), *Cancer Treatment - Conventional and Innovative Approaches* (Vol. Book 2, p. pp.257-283) : InTech.
- Blanco-Andujar, C., Ortega, D., Southern, P., Nesbitt, S.A., Thanh, N.T. et Pankhurst, Q.A. (2016). Real-time tracking of delayed-onset cellular apoptosis induced by intracellular magnetic hyperthermia. *Nanomedicine (Lond)*, 11(2), 121-136.
- Blank, V. (2008). Small Maf proteins in mammalian gene control: mere dimerization partners or dynamic transcriptional regulators? *J Mol Biol*, 376(4), 913-925.
- Bocci, V. et Valacchi, G. (2015). Nrf2 activation as target to implement therapeutic treatments. *Front Chem*, 3, 4.
- Bode, A.M. et Dong, Z. (2004). Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*, 4(10), 793-805.
- Bonzon, C., Bouchier-Hayes, L., Pagliari, L.J., Green, D.R. et Newmeyer, D.D. (2006). Caspase-2-induced apoptosis requires bid cleavage: a physiological role for bid in heat shock-induced death. *Mol Biol Cell*, 17(5), 2150-2157.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
- Brannon-Peppas, L. et Blanchette, J.O. (2004). Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 56(11), 1649-1659.
- Brunelle, J.K. et Letai, A. (2009). Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci*, 122(Pt 4), 437-441.
- Budanov, A.V. (2014). The role of tumor suppressor p53 in the antioxidant defense and metabolism. *Subcell Biochem*, 85, 337-358.
- Cairns, R.A., Harris, I., McCracken, S. et Mak, T.W. (2011). Cancer cell metabolism. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 76, 299-311.
- Calderwood, S.K., Khaleque, M.A., Sawyer, D.B. et Ciocca, D.R. (2006). Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci*, 31(3), 164-172.
- Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J.H., Hubbard, S.R., Harding, H.P., Clark, S.G. et Ron, D. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*, 415(6867), 92-96.

- Cardenas-Rodriguez, N., Coballase-Urrutia, E., Perez-Cruz, C., Montesinos-Correa, H., Rivera-Espinosa, L., Sampieri, A., 3rd et Carmona-Aparicio, L. (2014). Relevance of the glutathione system in temporal lobe epilepsy: evidence in human and experimental models. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 759293.
- Carmody, R.J. et Cotter, T.G. (2001). Signalling apoptosis: a radical approach. *Redox Rep*, 6(2), 77-90.
- Carmona-Aparicio, L., Perez-Cruz, C., Zavala-Tecuapetla, C., Granados-Rojas, L., Rivera-Espinosa, L., Montesinos-Correa, H., Hernandez-Damian, J., Pedraza-Chaverri, J., Sampieri, A., 3rd, Coballase-Urrutia, E. et Cardenas-Rodriguez, N. (2015). Overview of Nrf2 as Therapeutic Target in Epilepsy. *Int J Mol Sci*, 16(8), 18348-18367.
- Castedo, M., Perfettini, J.L., Roumier, T., Andreau, K., Medema, R. et Kroemer, G. (2004). Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*, 23(16), 2825-2837.
- Chaabane, W., User, S.D., El-Gazzah, M., Jaksik, R., Sajjadi, E., Rzeszowska-Wolny, J. et Los, M.J. (2013). Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 61(1), 43-58.
- Chae, S.Y., Kim, Y.S., Park, M.J., Yang, J., Park, H., Namgung, M.S., Rhim, H. et Lim, H.K. (2014). High-intensity focused ultrasound-induced, localized mild hyperthermia to enhance anti-cancer efficacy of systemic doxorubicin: an experimental study. *Ultrasound Med Biol*, 40(7), 1554-1563.
- Chandrika, B.B., Maney, S.K., Lekshmi, S.U. et Retnabhai, S.T. (2010). Endoplasmic reticulum targeted Bcl2 confers long term cell survival through phosphorylation of heat shock protein 27. *Int J Biochem Cell Biol*, 42(12), 1984-1992.
- Chen, W., Jiang, T., Wang, H., Tao, S., Lau, A., Fang, D. et Zhang, D.D. (2012). Does Nrf2 contribute to p53-mediated control of cell survival and death? *Antioxid Redox Signal*, 17(12), 1670-1675.
- Cominacini, L., Mozzini, C., Garbin, U., Pasini, A., Stranieri, C., Solani, E., Vallerio, P., Tinelli, I.A. et Fratta Pasini, A. (2015). Endoplasmic reticulum stress and Nrf2 signaling in cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med*, 88(Pt B), 233-242.
- Cragg, M.S., Harris, C., Strasser, A. et Scott, C.L. (2009). Unleashing the power of inhibitors of oncogenic kinases through BH3 mimetics. *Nat Rev Cancer*, 9(5), 321-326.
- Cullinan, S.B. et Diehl, J.A. (2006). Coordination of ER and oxidative stress signaling: the PERK/Nrf2 signaling pathway. *Int J Biochem Cell Biol*, 38(3), 317-332.
- Damasceno, F.C., Facci, R.R., da Silva, T.M. et Toledo, J.C., Jr. (2014). Mechanisms and kinetic profiles of superoxide-stimulated nitrosative processes in cells using a diaminofluorescein probe. *Free Radic Biol Med*, 77, 270-280.

- Das, L. et Vinayak, M. (2015). Long term effect of curcumin in restoration of tumour suppressor p53 and phase-II antioxidant enzymes via activation of Nrf2 signalling and modulation of inflammation in prevention of cancer. *PLoS One*, 10(4), e0124000.
- Davidson, W., Ren, Q., Kari, G., Kashi, O., Dicker, A.P. et Rodeck, U. (2008). Inhibition of p73 function by Pifithrin-alpha as revealed by studies in zebrafish embryos. *Cell Cycle*, 7(9), 1224-1230.
- Davies, K.J. (2000). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*, 50(4-5), 279-289.
- Dayalan Naidu, S., Kostov, R.V. et Dinkova-Kostova, A.T. (2015). Transcription factors Hsf1 and Nrf2 engage in crosstalk for cytoprotection. *Trends Pharmacol Sci*, 36(1), 6-14.
- Di Meo, S., Reed, T.T., Venditti, P. et Victor, V.M. (2016). Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 1245049.
- Dickinson, B.C., Huynh, C. et Chang, C.J. (2010). A palette of fluorescent probes with varying emission colors for imaging hydrogen peroxide signaling in living cells. *J Am Chem Soc*, 132(16), 5906-5915.
- Dotsch, V., Bernassola, F., Coutandin, D., Candi, E. et Melino, G. (2010). p63 and p73, the ancestors of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(9), a004887.
- El-Orabi, N.F., Rogers, C.B., Gray Edwards, H. et Schwartz, D.D. (2011). Heat-induced inhibition of superoxide dismutase and accumulation of reactive oxygen species leads to HT-22 neuronal cell death. *Journal of Thermal Biology*, 36(1), 49-56.
- Espinosa-Diez, C., Miguel, V., Mennerich, D., Kietzmann, T., Sanchez-Perez, P., Cadenas, S. et Lamas, S. (2015). Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol*, 6, 183-197.
- Evans, S.S., Repasky, E.A. et Fisher, D.T. (2015). Fever and the thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat. *Nat Rev Immunol*, 15(6), 335-349.
- Fan, X., Chen, P., Tan, H., Zeng, H., Jiang, Y., Wang, Y., Wang, Y., Hou, X., Bi, H. et Huang, M. (2014). Dynamic and coordinated regulation of KEAP1-NRF2-ARE and p53/p21 signaling pathways is associated with acetaminophen injury responsive liver regeneration. *Drug Metab Dispos*, 42(9), 1532-1539.
- Fang, H., Harned, T.M., Kalous, O., Maldonado, V., DeClerck, Y.A. et Reynolds, C.P. (2011). Synergistic activity of fenretinide and the Bcl-2 family protein inhibitor ABT-737 against human neuroblastoma. *Clin Cancer Res*, 17(22), 7093-7104.
- Fink, S.L. et Cookson, B.T. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun*, 73(4), 1907-1916.

- Flanagan, S.W., Moseley, P.L. et Buettner, G.R. (1998). Increased flux of free radicals in cells subjected to hyperthermia: detection by electron paramagnetic resonance spin trapping. *FEBS Lett*, 431(2), 285-286.
- Fokas, E., McKenna, W.G. et Muschel, R.J. (2012). The impact of tumor microenvironment on cancer treatment and its modulation by direct and indirect antivascular strategies. *Cancer Metastasis Rev*, 31(3-4), 823-842.
- Frenzel, A., Grespi, F., Chmielewski, W. et Villunger, A. (2009). Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer. *Apoptosis*, 14(4), 584-596.
- Fulda, S. (2015). Targeting apoptosis for anticancer therapy. *Semin Cancer Biol*, 31, 84-88.
- Fulda, S. et Kogel, D. (2015). Cell death by autophagy: emerging molecular mechanisms and implications for cancer therapy. *Oncogene*, 34(40), 5105-5113.
- Gabai, V.L., Mabuchi, K., Mosser, D.D. et Sherman, M.Y. (2002). Hsp72 and stress kinase c-jun N-terminal kinase regulate the bid-dependent pathway in tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*, 22(10), 3415-3424.
- Gan, L. et Johnson, J.A. (2014). Oxidative damage and the Nrf2-ARE pathway in neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1842(8), 1208-1218.
- Gandhi, L., Camidge, D.R., Ribeiro de Oliveira, M., Bonomi, P., Gandara, D., Khaira, D., Hann, C.L., McKeegan, E.M., Litvinovich, E., Hemken, P.M., Dive, C., Enschede, S.H., Nolan, C., Chiu, Y.L., Busman, T., Xiong, H., Krivoschik, A.P., Humerickhouse, R., Shapiro, G.I. et Rudin, C.M. (2011). Phase I study of Navitoclax (ABT-263), a novel Bcl-2 family inhibitor, in patients with small-cell lung cancer and other solid tumors. *J Clin Oncol*, 29(7), 909-916.
- Geismann, C., Arlt, A., Sebens, S. et Schafer, H. (2014). Cytoprotection "gone astray": Nrf2 and its role in cancer. *Onco Targets Ther*, 7, 1497-1518.
- Geneste, O. (2014). Acting on the BCL2 dependence of cancer cells. *Medicographia*(36), 319-325.
- Gerner, E.W., Boone, R., Connor, W.G., Hicks, J.A. et Boone, M.L. (1976). A transient thermotolerant survival response produced by single thermal doses in HeLa cells. *Cancer Res*, 36(3), 1035-1040.
- Gill, R.R., Gbur, C.J., Jr., Fisher, B.J., Hess, M.L., Fowler, A.A., 3rd, Kukreja, R.C. et Sholley, M.M. (1998). Heat shock provides delayed protection against oxidative injury in cultured human umbilical vein endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol*, 30(12), 2739-2749.
- Girnun, G.D., Domann, F.E., Moore, S.A. et Robbins, M.E. (2002). Identification of a functional peroxisome proliferator-activated receptor response element in the rat catalase promoter. *Mol Endocrinol*, 16(12), 2793-2801.
- Glorieux, C., Zamocky, M., Sandoval, J.M., Verrax, J. et Calderon, P.B. (2015). Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. *Free Radic Biol Med*, 87, 84-97.



- Glory, A., Bettaieb, A. et Averill-Bates, D.A. (2014). Mild thermotolerance induced at 40 degrees C protects cells against hyperthermia-induced pro-apoptotic changes in Bcl-2 family proteins. *Int J Hyperthermia*, 30(7), 502-512.
- Gorrini, C., Harris, I.S. et Mak, T.W. (2013). Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov*, 12(12), 931-947.
- Grisham, M.B. (2013). Methods to detect hydrogen peroxide in living cells: Possibilities and pitfalls. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 165(4), 429-438.
- Gupta, A., Cooper, Z.A., Tulapurkar, M.E., Potla, R., Maity, T., Hasday, J.D. et Singh, I.S. (2013). Toll-like receptor agonists and febrile range hyperthermia synergize to induce heat shock protein 70 expression and extracellular release. *J Biol Chem*, 288(4), 2756-2766.
- Hahn, M.E., Timme-Laragy, A.R., Karchner, S.I. et Stegeman, J.J. (2015). Nrf2 and Nrf2-related proteins in development and developmental toxicity: Insights from studies in zebrafish (*Danio rerio*). *Free Radic Biol Med*, 88(Pt B), 275-289.
- Hanahan, D. et Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.
- Hanahan, D. et Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- Henderson, B.W. et Dougherty, T.J. (1992). How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol*, 55(1), 145-157.
- Henle, K.J., Karamuz, J.E. et Leeper, D.B. (1978). Induction of thermotolerance in Chinese hamster ovary cells by high (45 degrees) or low (40 degrees) hyperthermia. *Cancer Res*, 38(3), 570-574.
- Hildebrandt, B., Wust, P., Ahlers, O., Dieing, A., Sreenivasa, G., Kerner, T., Felix, R. et Riess, H. (2002). The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Crit Rev Oncol Hematol*, 43(1), 33-56.
- Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D.B. et Johnston, P.G. (2013). Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer*, 13(10), 714-726.
- Holsapple, M.P. et Wallace, K.B. (2008). Dose response considerations in risk assessment--an overview of recent ILSI activities. *Toxicol Lett*, 180(2), 85-92.
- Horsman, M.R. et Overgaard, J. (2007). Hyperthermia: a potent enhancer of radiotherapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 19(6), 418-426.
- Hsu, S.F., Chao, C.M., Huang, W.T., Lin, M.T. et Cheng, B.C. (2013). Attenuating heat-induced cellular autophagy, apoptosis and damage in H9c2 cardiomyocytes by pre-inducing HSP70 with heat shock preconditioning. *Int J Hyperthermia*, 29(3), 239-247.
- Huang, X.J., Song, C.X., Zhong, C.Q. et Wang, F.S. (2012). Research progress in the radioprotective effect of superoxide dismutase. *Drug Discov Ther*, 6(4), 169-177.
- Institut National du Cancer. (2014). Récupéré le Décembre 2015 de <http://www.e-cancer.fr/>



- Issels, R.D. (2008). Hyperthermia adds to chemotherapy. *Eur J Cancer*, 44(17), 2546-2554.
- Itoh, K., Ye, P., Matsumiya, T., Tanji, K. et Ozaki, T. (2015). Emerging functional cross-talk between the Keap1-Nrf2 system and mitochondria. *J Clin Biochem Nutr*, 56(2), 91-97.
- Jin, Z. et El-Deiry, W.S. (2005). Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther*, 4(2), 139-163.
- Johansen, J.S., Harris, A.K., Rychly, D.J. et Ergul, A. (2005). Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc Diabetol*, 4, 5.
- Johnson, D.A. et Johnson, J.A. (2015). Nrf2-a therapeutic target for the treatment of neurodegenerative diseases. *Free Radic Biol Med*, 88(Pt B), 253-267.
- Jolesch, A., Elmer, K., Bendz, H., Issels, R.D. et Noessner, E. (2012). Hsp70, a messenger from hyperthermia for the immune system. *Eur J Cell Biol*, 91(1), 48-52.
- Kalyanaraman, B., Darley-USmar, V., Davies, K.J., Dennery, P.A., Forman, H.J., Grisham, M.B., Mann, G.E., Moore, K., Roberts, L.J., 2nd et Ischiropoulos, H. (2012). Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic Biol Med*, 52(1), 1-6.
- Kansanen, E., Kuosmanen, S.M., Leinonen, H. et Levonen, A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol*, 1, 45-49.
- Kaur, P., Reis, M., Couchman, G., Forjuoh, S., Greene, J., Jr. et Asea, A. (2010). Role of Heat Shock Proteins in Obesity and Type 2 Diabetes. Dans Asea, A. A. et B. K. Pedersen (dir.), *Heat Shock Proteins and Whole Body Physiology* (Vol. 5, p. 19-29) : Springer Netherlands.
- Kennedy, D., Jager, R., Mosser, D.D. et Samali, A. (2014). Regulation of apoptosis by heat shock proteins. *IUBMB Life*, 66(5), 327-338.
- Kennedy, D., Mnich, K. et Samali, A. (2014). Heat shock preconditioning protects against ER stress-induced apoptosis through the regulation of the BH3-only protein BIM. *FEBS Open Bio*, 4, 813-821.
- Kensler, T.W., Qian, G.S., Chen, J.G. et Groopman, J.D. (2003). Translational strategies for cancer prevention in liver. *Nat Rev Cancer*, 3(5), 321-329.
- Kikuchi, G., Yoshida, T. et Noguchi, M. (2005). Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem Biophys Res Commun*, 338(1), 558-567.
- Kim, P.K., Zamora, R., Petrosko, P. et Billiar, T.R. (2001). The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. *Int Immunopharmacol*, 1(8), 1421-1441.
- Kimura, H., Sawada, T., Oshima, S., Kozawa, K., Ishioka, T. et Kato, M. (2005). Toxicity and roles of reactive oxygen species. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 4(4), 489-495.
- Kobayashi, M. et Yamamoto, M. (2005). Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxid Redox Signal*, 7(3-4), 385-394.

- Komarov, P.G., Komarova, E.A., Kondratov, R.V., Christov-Tselkov, K., Coon, J.S., Chernov, M.V. et Gudkov, A.V. (1999). A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science*, 285(5434), 1733-1737.
- Kossatz, S., Grandke, J., Couleaud, P., Latorre, A., Aires, A., Crosbie-Staunton, K., Ludwig, R., Dahring, H., Ettelt, V., Lazaro-Carrillo, A., Calero, M., Sader, M., Courty, J., Volkov, Y., Prina-Mello, A., Villanueva, A., Somoza, A., Cortajarena, A.L., Miranda, R. et Hilger, I. (2015). Efficient treatment of breast cancer xenografts with multifunctionalized iron oxide nanoparticles combining magnetic hyperthermia and anti-cancer drug delivery. *Breast Cancer Res*, 17, 66.
- Krakstad, C. et Chekenya, M. (2010). Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. *Mol Cancer*, 9, 135.
- Kregel, K.C. (2002). Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol*, 92(5), 2177-2186.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Landry, J., Bernier, D., Chretien, P., Nicole, L.M., Tanguay, R.M. et Marceau, N. (1982). Synthesis and degradation of heat shock proteins during development and decay of thermotolerance. *Cancer Res*, 42(6), 2457-2461.
- Landry, J., Chretien, P., Lambert, H., Hickey, E. et Weber, L.A. (1989). Heat shock resistance conferred by expression of the human HSP27 gene in rodent cells. *J Cell Biol*, 109(1), 7-15.
- Lepock, J.R. (2005). How do cells respond to their thermal environment? *Int J Hyperthermia*, 21(8), 681-687.
- Lessene, G., Czabotar, P.E. et Colman, P.M. (2008). BCL-2 family antagonists for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*, 7(12), 989-1000.
- Lindquist, S. (1986). The heat-shock response. *Annu Rev Biochem*, 55, 1151-1191.
- Lippert, A.R., Van de Bittner, G.C. et Chang, C.J. (2011). Boronate oxidation as a bioorthogonal reaction approach for studying the chemistry of hydrogen peroxide in living systems. *Acc Chem Res*, 44(9), 793-804.
- Lord-Fontaine, S. et Averill-Bates, D.A. (2002). Heat shock inactivates cellular antioxidant defenses against hydrogen peroxide: protection by glucose. *Free Radic Biol Med*, 32(8), 752-765.
- Lu, J. et Holmgren, A. (2014). The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic Biol Med*, 66, 75-87.
- Lucena, S.R., Salazar, N., Gracia-Cazana, T., Zamarron, A., Gonzalez, S., Juarranz, A. et Gilaberte, Y. (2015). Combined Treatments with Photodynamic Therapy for Non-Melanoma Skin Cancer. *Int J Mol Sci*, 16(10), 25912-25933.
- Mahajan, I.M., Chen, M.D., Muro, I., Robertson, J.D., Wright, C.W. et Bratton, S.B. (2014). BH3-only protein BIM mediates heat shock-induced apoptosis. *PLoS One*, 9(1), e84388.

- Malietzis, G., Monzon, L., Hand, J., Wasan, H., Leen, E., Abel, M., Muhammad, A., Price, P. et Abel, P. (2013). High-intensity focused ultrasound: advances in technology and experimental trials support enhanced utility of focused ultrasound surgery in oncology. *Br J Radiol*, 86(1024), 20130044.
- Maloney, E. et Hwang, J.H. (2015). Emerging HIFU applications in cancer therapy. *Int J Hyperthermia*, 31(3), 302-309.
- Marquez, C.M., Sneed, P.K., Li, G.C., Mak, J.Y. et Phillips, T.L. (1994). HSP 70 synthesis in clinical hyperthermia patients: preliminary results of a new technique. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 28(2), 425-430.
- Martindale, J.L. et Holbrook, N.J. (2002). Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol*, 192(1), 1-15.
- Mc Gee, M.M. (2015). Targeting the Mitotic Catastrophe Signaling Pathway in Cancer. *Mediators Inflamm*, 2015, 146282.
- McGuire, S. (2016). World Cancer Report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, WHO Press, 2015. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 7(2), 418-419.
- McMillan, D.R., Xiao, X., Shao, L., Graves, K. et Benjamin, I.J. (1998). Targeted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis. *J Biol Chem*, 273(13), 7523-7528.
- Melino, G., Bernassola, F., Ranalli, M., Yee, K., Zong, W.X., Corazzari, M., Knight, R.A., Green, D.R., Thompson, C. et Vousden, K.H. (2004). p73 Induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation. *J Biol Chem*, 279(9), 8076-8083.
- Mfouo-Tynga, I. et Abrahamse, H. (2015). Cell death pathways and phthalocyanine as an efficient agent for photodynamic cancer therapy. *Int J Mol Sci*, 16(5), 10228-10241.
- Milleron, R.S. et Bratton, S.B. (2007). 'Heated' debates in apoptosis. *Cell Mol Life Sci*, 64(18), 2329-2333.
- Mitsuishi, Y., Motohashi, H. et Yamamoto, M. (2012). The Keap1-Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism. *Front Oncol*, 2, 200.
- Moriyama-Gonda, N., Igawa, M., Shiina, H., Urakami, S., Wada, Y. et Terashima, M. (2000). Heat-induced cellular damage and tolerance in combination with adriamycin for the PC-3 prostate cancer cell line: relationships with cytotoxicity, reactive oxygen species and heat shock protein 70 expression. *Eur Urol*, 38(2), 235-240.
- Mosser, D.D. et Morimoto, R.I. (2004). Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. *Oncogene*, 23(16), 2907-2918.
- Muckle, D.S. et Dickson, J.A. (1973). Hyperthermia (42 degrees C) as an adjuvant to radiotherapy and chemotherapy in the treatment of the allogeneic VX2 carcinoma in the rabbit. *Br J Cancer*, 27(4), 307-315.
- Muller, M., Schleithoff, E.S., Stremmel, W., Melino, G., Krammer, P.H. et Schilling, T. (2006). One, two, three--p53, p63, p73 and chemosensitivity. *Drug Resist Updat*, 9(6), 288-306.

- Negroni, A., Cucchiara, S. et Stronati, L. (2015). Apoptosis, Necrosis, and Necroptosis in the Gut and Intestinal Homeostasis. *Mediators Inflamm*, 2015, 250762.
- Neves, H. et Kwok, H.F. (2015). Recent advances in the field of anti-cancer immunotherapy. *BBA Clin*, 3, 280-288.
- Niforou, K., Cheimonidou, C. et Trougakos, I.P. (2014). Molecular chaperones and proteostasis regulation during redox imbalance. *Redox Biol*, 2, 323-332.
- Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K. et Tavernarakis, N. (2013). Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta*, 1833(12), 3448-3459.
- Niture, S.K. et Jaiswal, A.K. (2012). Nrf2 protein up-regulates antiapoptotic protein Bcl-2 and prevents cellular apoptosis. *J Biol Chem*, 287(13), 9873-9886.
- Niture, S.K. et Jaiswal, A.K. (2013). Nrf2-induced antiapoptotic Bcl-xL protein enhances cell survival and drug resistance. *Free Radic Biol Med*, 57, 119-131.
- Niture, S.K., Khatri, R. et Jaiswal, A.K. (2014). Regulation of Nrf2-an update. *Free Radic Biol Med*, 66, 36-44.
- No, J.H., Kim, Y.B. et Song, Y.S. (2014). Targeting nrf2 signaling to combat chemoresistance. *J Cancer Prev*, 19(2), 111-117.
- O'Connell, M.A. et Hayes, J.D. (2015). The Keap1/Nrf2 pathway in health and disease: from the bench to the clinic. *Biochem Soc Trans*, 43(4), 687-689.
- Oltersdorf, T., Elmore, S.W., Shoemaker, A.R., Armstrong, R.C., Augeri, D.J., Belli, B.A., Bruncko, M., Deckwerth, T.L., Dinges, J., Hajduk, P.J., Joseph, M.K., Kitada, S., Korsmeyer, S.J., Kunzer, A.R., Letai, A., Li, C., Mitten, M.J., Nettesheim, D.G., Ng, S., Nimmer, P.M., O'Connor, J.M., Oleksijew, A., Petros, A.M., Reed, J.C., Shen, W., Tahir, S.K., Thompson, C.B., Tomaselli, K.J., Wang, B., Wendt, M.D., Zhang, H., Fesik, S.W. et Rosenberg, S.H. (2005). An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature*, 435(7042), 677-681.
- Organisation mondiale de la santé. (2015). *Récupéré le Décembre 2015 de* <http://www.who.int/fr/>
- Ostberg, J.R., Kaplan, K.C. et Repasky, E.A. (2002). Induction of stress proteins in a panel of mouse tissues by fever-range whole body hyperthermia. *Int J Hyperthermia*, 18(6), 552-562.
- Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S. et Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, 12(5), 913-922.
- Pagliari, L.J., Kuwana, T., Bonzon, C., Newmeyer, D.D., Tu, S., Beere, H.M. et Green, D.R. (2005). The multidomain proapoptotic molecules Bax and Bak are directly activated by heat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(50), 17975-17980.
- Pallepati, P. et Averill-Bates, D.A. (2010). Mild thermotolerance induced at 40 degrees C increases antioxidants and protects HeLa cells against mitochondrial apoptosis induced by hydrogen peroxide: Role of p53. *Arch Biochem Biophys*, 495(2), 97-111.



- Pallepati, P. et Averill-Bates, D.A. (2011a). Activation of ER stress and apoptosis by hydrogen peroxide in HeLa cells: protective role of mild heat preconditioning at 40 degrees C. *Biochim Biophys Acta*, 1813(12), 1987-1999.
- Pallepati, P. et Averill-Bates, D.A. (2011b). Mild thermotolerance induced at 40 degrees C protects HeLa cells against activation of death receptor-mediated apoptosis by hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med*, 50(6), 667-679.
- Pallepati, P. et Averill-Bates, D.A. (2011c). Reactive Oxygen Species, Cell Death Signaling and Apoptosis. Dans Pantopoulos, K. et H. Schipper (dir.), *Principles of Free Radical Biomedicine* (p. 513-546). Montreal, QC : Nova Science Publishers, Inc.
- Paul, C., Manero, F., Gonin, S., Kretz-Remy, C., Viot, S. et Arrigo, A.P. (2002). Hsp27 as a negative regulator of cytochrome C release. *Mol Cell Biol*, 22(3), 816-834.
- Pelicano, H., Carney, D. et Huang, P. (2004). ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat*, 7(2), 97-110.
- Petrovich, Z., Langholz, B., Gibbs, F.A., Sapozink, M.D., Kapp, D.S., Stewart, R.J., Emami, B., Oleson, J., Senzer, N., Slater, J. et al. (1989). Regional hyperthermia for advanced tumors: a clinical study of 353 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 16(3), 601-607.
- Pincemail, J., Sergeant, O., Detry, O., Gaspar, Y., Cheramy-Bien, J.P., Cillard, J., Meurisse, M. et Defraigne, J.O. (2002). Intracellular free iron content of rat liver tissue after cold ischemia. *Transplant Proc*, 34(3), 759-761.
- Portt, L., Norman, G., Clapp, C., Greenwood, M. et Greenwood, M.T. (2011). Anti-apoptosis and cell survival: a review. *Biochim Biophys Acta*, 1813(1), 238-259.
- Przybytkowski, E., Bates, J.H., Bates, D.A. et Mackillop, W.J. (1986). Thermal adaptation in CHO cells at 40 degrees C: the influence of growth conditions and the role of heat shock proteins. *Radiat Res*, 107(3), 317-331.
- Rhee, S.G., Kang, S.W., Chang, T.S., Jeong, W. et Kim, K. (2001). Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life*, 52(1-2), 35-41.
- Richter, K., Haslbeck, M. et Buchner, J. (2010). The heat shock response: life on the verge of death. *Mol Cell*, 40(2), 253-266.
- Rinaldi Tosi, M.E., Bocanegra, V., Manucha, W., Gil Lorenzo, A. et Valles, P.G. (2011). The Nrf2-Keap1 cellular defense pathway and heat shock protein 70 (Hsp70) response. Role in protection against oxidative stress in early neonatal unilateral ureteral obstruction (UUO). *Cell Stress Chaperones*, 16(1), 57-68.
- Robertson, J.D., Datta, K. et Kehrer, J.P. (1997). Bcl-xL overexpression restricts heat-induced apoptosis and influences hsp70, bcl-2, and Bax protein levels in FL5.12 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 241(1), 164-168.
- Rodrigo, R., Guichard, C. et Charles, R. (2007). Clinical pharmacology and therapeutic use of antioxidant vitamins. *Fundam Clin Pharmacol*, 21(2), 111-127.



- Rooswinkel, R.W., van de Kooij, B., Verheij, M. et Borst, J. (2012). Bcl-2 is a better ABT-737 target than Bcl-xL or Bcl-w and only Noxa overcomes resistance mediated by Mcl-1, Bfl-1, or Bcl-B. *Cell Death Dis*, 3, e366.
- Ross, D. et Siegel, D. (2004). NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1, DT-diaphorase), functions and pharmacogenetics. *Methods Enzymol*, 382, 115-144.
- Rotblat, B., Melino, G. et Knight, R.A. (2012). NRF2 and p53: Januses in cancer? *Oncotarget*, 3(11), 1272-1283.
- Roti Roti, J.L. (2008). Cellular responses to hyperthermia (40-46 degrees C): cell killing and molecular events. *Int J Hyperthermia*, 24(1), 3-15.
- Sakaguchi, Y., Stephens, L.C., Makino, M., Kaneko, T., Strebel, F.R., Danhauser, L.L., Jenkins, G.N. et Bull, J.M. (1995). Apoptosis in tumors and normal tissues induced by whole body hyperthermia in rats. *Cancer Res*, 55(22), 5459-5464.
- Samali, A., Cai, J., Zhivotovsky, B., Jones, D.P. et Orrenius, S. (1999). Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. *EMBO J*, 18(8), 2040-2048.
- Satoh, T., Rezaie, T., Seki, M., Sunico, C.R., Tabuchi, T., Kitagawa, T., Yanagitai, M., Senzaki, M., Kosegawa, C., Taira, H., McKercher, S.R., Hoffman, J.K., Roth, G.P. et Lipton, S.A. (2011). Dual neuroprotective pathways of a pro-electrophilic compound via HSF-1-activated heat-shock proteins and Nrf2-activated phase 2 antioxidant response enzymes. *J Neurochem*, 119(3), 569-578.
- Schroder, M. et Kaufman, R.J. (2005). ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res*, 569(1-2), 29-63.
- Setroikromo, R., Wierenga, P.K., van Waarde, M.A., Brunsting, J.F., Vellenga, E. et Kampinga, H.H. (2007). Heat shock proteins and Bcl-2 expression and function in relation to the differential hyperthermic sensitivity between leukemic and normal hematopoietic cells. *Cell Stress Chaperones*, 12(4), 320-330.
- Shellman, Y.G., Howe, W.R., Miller, L.A., Goldstein, N.B., Pacheco, T.R., Mahajan, R.L., LaRue, S.M. et Norris, D.A. (2008). Hyperthermia induces endoplasmic reticulum-mediated apoptosis in melanoma and non-melanoma skin cancer cells. *J Invest Dermatol*, 128(4), 949-956.
- Shelton, S.N., Dillard, C.D. et Robertson, J.D. (2010). Activation of caspase-9, but not caspase-2 or caspase-8, is essential for heat-induced apoptosis in Jurkat cells. *J Biol Chem*, 285(52), 40525-40533.
- Shortt, J. et Johnstone, R.W. (2012). Oncogenes in cell survival and cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(12)
- Simon, H.U., Haj-Yehia, A. et Levi-Schaffer, F. (2000). Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*, 5(5), 415-418.
- Singh, I.S. et Hasday, J.D. (2013). Fever, hyperthermia and the heat shock response. *Int J Hyperthermia*, 29(5), 423-435.

- Société Canadienne du Cancer. (2015). Récupéré le Décembre 2015 de <http://www.cancer.ca/en/?region=on>
- Song, C.W., Park, H.J., Lee, C.K. et Griffin, R. (2005). Implications of increased tumor blood flow and oxygenation caused by mild temperature hyperthermia in tumor treatment. *Int J Hyperthermia*, 21(8), 761-767.
- Sonna, L.A., Fujita, J., Gaffin, S.L. et Lilly, C.M. (2002). Invited review: Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *J Appl Physiol* (1985), 92(4), 1725-1742.
- Sovolyova, N., Healy, S., Samali, A. et Logue, S.E. (2014). Stressed to death - mechanisms of ER stress-induced cell death. *Biol Chem*, 395(1), 1-13.
- Stankiewicz, A.R., Lachapelle, G., Foo, C.P., Radicioni, S.M. et Mosser, D.D. (2005). Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J Biol Chem*, 280(46), 38729-38739.
- Stankiewicz, A.R., Livingstone, A.M., Mohseni, N. et Mosser, D.D. (2009). Regulation of heat-induced apoptosis by Mcl-1 degradation and its inhibition by Hsp70. *Cell Death Differ*, 16(4), 638-647.
- Steel, R., Doherty, J.P., Buzzard, K., Clemons, N., Hawkins, C.J. et Anderson, R.L. (2004). Hsp72 inhibits apoptosis upstream of the mitochondria and not through interactions with Apaf-1. *J Biol Chem*, 279(49), 51490-51499.
- Strasser, A. et Anderson, R.L. (1995). Bcl-2 and thermotolerance cooperate in cell survival. *Cell Growth Differ*, 6(7), 799-805.
- Subject, J.R., Sciandra, J.J. et Johnson, R.J. (1982). Heat shock proteins and thermotolerance; a comparison of induction kinetics. *Br J Radiol*, 55(656), 579-584.
- Sugahara, T., van der Zee, J., Kampinga, H.H., Vujaskovic, Z., Kondo, M., Ohnishi, T., Li, G., Park, H.J., Leeper, D.B., Ostapenko, V., Repasky, E.A., Watanabe, M. et Song, C.W. (2008). Kadota Fund International Forum 2004. Application of thermal stress for the improvement of health, 15-18 June 2004, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji Island, Hyogo, Japan. Final report. *Int J Hyperthermia*, 24(2), 123-140.
- Suit, H.D. et Shwayder, M. (1974). Hyperthermia: potential as an anti-tumor agent. *Cancer*, 34(1), 122-129.
- Sumo. (2009). Récupéré le Décembre 2015 de <http://www.sumo.com.hk/>
- Suzuki, T., Blank, V., Sesay, J.S. et Crawford, D.R. (2001). Maf genes are involved in multiple stress response in human. *Biochem Biophys Res Commun*, 280(1), 4-8.
- Suzuki, T. et Yamamoto, M. (2015). Molecular basis of the Keap1-Nrf2 system. *Free Radic Biol Med*, 88(Pt B), 93-100.
- Synergo. (2015). Récupéré le Décembre 2015 de <http://www.synergo-medical.com/>
- Szegezdi, E., Macdonald, D.C., Ni Chonghaile, T., Gupta, S. et Samali, A. (2009). Bcl-2 family on guard at the ER. *Am J Physiol Cell Physiol*, 296(5), C941-953.

- Tonino, S.H., van Laar, J., van Oers, M.H., Wang, J.Y., Eldering, E. et Kater, A.P. (2011). ROS-mediated upregulation of Noxa overcomes chemoresistance in chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene*, 30(6), 701-713.
- Tung, M.C., Lin, P.L., Wang, Y.C., He, T.Y., Lee, M.C., Yeh, S.D., Chen, C.Y. et Lee, H. (2015). Mutant p53 confers chemoresistance in non-small cell lung cancer by upregulating Nrf2. *Oncotarget*, 6(39), 41692-41705.
- Valente, L.J., Gray, D.H., Michalak, E.M., Pinon-Hofbauer, J., Egle, A., Scott, C.L., Janic, A. et Strasser, A. (2013). p53 efficiently suppresses tumor development in the complete absence of its cell-cycle inhibitory and proapoptotic effectors p21, Puma, and Noxa. *Cell Rep*, 3(5), 1339-1345.
- van der Zee, J. (2002). Heating the patient: a promising approach? *Ann Oncol*, 13(8), 1173-1184.
- van der Zee, J., Vujaskovic, Z., Kondo, M. et Sugahara, T. (2008). The Kadota Fund International Forum 2004--clinical group consensus. *Int J Hyperthermia*, 24(2), 111-122.
- Vela, L. et Marzo, I. (2015). Bcl-2 family of proteins as drug targets for cancer chemotherapy: the long way of BH3 mimetics from bench to bedside. *Curr Opin Pharmacol*, 23, 74-81.
- Vogler, M., Furdas, S.D., Jung, M., Kuwana, T., Dyer, M.J. et Cohen, G.M. (2010). Diminished sensitivity of chronic lymphocytic leukemia cells to ABT-737 and ABT-263 due to albumin binding in blood. *Clin Cancer Res*, 16(16), 4217-4225.
- Wakabayashi, N., Slocum, S.L., Skoko, J.J., Shin, S. et Kensler, T.W. (2010). When NRF2 talks, who's listening? *Antioxid Redox Signal*, 13(11), 1649-1663.
- Wilson, W.H., O'Connor, O.A., Czuczman, M.S., LaCasce, A.S., Gerecitano, J.F., Leonard, J.P., Tulpule, A., Dunleavy, K., Xiong, H., Chiu, Y.L., Cui, Y., Busman, T., Elmore, S.W., Rosenberg, S.H., Krivoshik, A.P., Enschede, S.H. et Humerickhouse, R.A. (2010). Navitoclax, a targeted high-affinity inhibitor of BCL-2, in lymphoid malignancies: a phase 1 dose-escalation study of safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and antitumour activity. *Lancet Oncol*, 11(12), 1149-1159.
- Wong, A.H. et Deng, C.X. (2015). Precision Medicine for Personalized Cancer Therapy. *Int J Biol Sci*, 11(12), 1410-1412.
- Wrzal, P.K., Bettaieb, A. et Averill-Bates, D.A. (2008). Molecular mechanisms of apoptosis activation by heat shock in multidrug-resistant Chinese hamster cells. *Radiat Res*, 170(4), 498-511.
- Wu, S., Hou, J., Ding, Y., Wu, F., Hu, Y., Jiang, Q., Mao, P. et Yang, Y. (2015). Cryoablation Versus Radiofrequency Ablation for Hepatic Malignancies: A Systematic Review and Literature-Based Analysis. *Medicine (Baltimore)*, 94(49), e2252.
- Wust, P., Hildebrandt, B., Sreenivasa, G., Rau, B., Gellermann, J., Riess, H., Felix, R. et Schlag, P.M. (2002). Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol*, 3(8), 487-497.

- Yang, J., Hong, Y., Wang, W., Wu, W., Chi, Y., Zong, H., Kong, X., Wei, Y., Yun, X., Cheng, C., Chen, K. et Gu, J. (2009). HSP70 protects BCL2L12 and BCL2L12A from N-terminal ubiquitination-mediated proteasomal degradation. *FEBS Lett*, 583(9), 1409-1414.
- Youle, R.J. et Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(1), 47-59.
- Yu, J. et Zhang, L. (2008). PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene*, 27 Suppl 1, S71-83.
- Yuguchi, T., Saito, M., Yokoyama, Y., Saito, T., Nagata, T., Sakamoto, T. et Tsukada, K. (2002). Combined use of hyperthermia and irradiation cause antiproliferative activity and cell death to human esophageal cell carcinoma cells--mainly cell cycle examination. *Hum Cell*, 15(1), 33-42.
- Zhang, Ahn, Y.H., Benjamin, I.J., Honda, T., Hicks, R.J., Calabrese, V., Cole, P.A. et Dinkova-Kostova, A.T. (2011). HSF1-dependent upregulation of Hsp70 by sulfhydryl-reactive inducers of the KEAP1/NRF2/ARE pathway. *Chem Biol*, 18(11), 1355-1361.
- Zhang, H., Davies, K.J. et Forman, H.J. (2015). Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging. *Free Radic Biol Med*, 88(Pt B), 314-336.
- Zhang, L.N., Li, J.Y. et Xu, W. (2013). A review of the role of Puma, Noxa and Bim in the tumorigenesis, therapy and drug resistance of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Gene Ther*, 20(1), 1-7.
- Zhou, Y., Sun, J. et Yang, X. (2015). Molecular Imaging-Guided Interventional Hyperthermia in Treatment of Breast Cancer. *Biomed Res Int*, 2015, 505269.